

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Ensayo sobre anatomía, palinología y fitoquímica de especies españolas de la sección *Trichophyllae* B.S.G. del género *Grimmia* Hedw. (Bryopsida, Bryophyta).**

**TESIS DOCTORAL**

**BELÉN ESTÉBANEZ PÉREZ**

**Madrid, febrero de 1995**

BELÉN  
ESTÉBANEZ  
PÉREZ

Ensayo sobre anatomía, palinología y fitoquímica de especies españolas de las  
sección *Trichophyllae* B.S.G. del género *Grimmia* Hedw. (Bryopsida, Bryophyta).

TESIS DOCTORAL

1995

¡Qué vergüenza! Después de  
terminar la tesis "al filo de  
lo imposible," descubro que  
hay una errata imperdonable.  
Y es que se me pueden  
olvidar las láminas, o las  
leyendas, o las conclusiones,  
o incluso firmar los ejemplares.  
¡Pero la dedicatoria del ejemplar de  
Dr. Eugenia...! Aunque sea 9 meses  
después, ya imaginas con cuánto cariño te la dedico. (12/12/95)

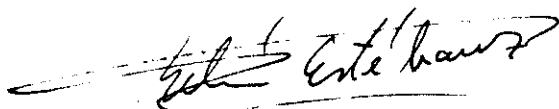


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Ensayo sobre anatomía, palinología y fitoquímica  
de especies españolas de la sección  
*Trichophyllae* B.S.G. del género *Grimmia* Hedw.  
(Bryopsida, Bryophyta).**

Memoria presentada por

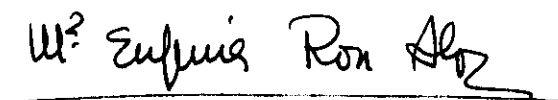
BELEN ESTÉBANEZ PÉREZ



para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Trabajo realizado bajo la dirección de la doctora

EUGENIA RON ÁLVAREZ



Madrid, febrero de 1995

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradezco a la Dra. Eugenia Ron, Directora de esta tesis, su extraordinario interés y dedicación a lo largo de todas las fases de su realización, tanto en la orientación y desarrollo de la investigación, donde puso de manifiesto su increíble conocimiento botánico y creatividad científica, como durante la confección material de la Memoria doctoral, en la que me proporcionó todo tipo de medios que necesitara, y colaboró con absoluta entrega incluso en las tareas más mecánicas y tediosas. Quiero resaltar también su ayuda en el plano personal a lo largo de estos años, que ha conseguido mantener viva la ilusión por una "aventura investigadora", que no siempre se sabía cómo iba a concluir (ni siquiera, a veces, qué rumbo iba a tomar a corto plazo). Trabajar a su lado, bajo su dirección, ha sido una experiencia personal y científica enormemente enriquecedora.

También expreso mi más profundo reconocimiento al Dr. Jaime Bermejo, del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología de La Laguna (Tenerife), a quien se debe la parte fitoquímica. Su colaboración, totalmente desinteresada, y su dedicación y paciencia, durante el tiempo que estuve en su laboratorio, y en la corrección del manuscrito, han sido un estímulo importante en esta investigación.

Asimismo, en cuanto a esta parte de la tesis, quiero agradecer a los Dres. Arturo Velasco y M<sup>a</sup> José Pérez Alonso su colaboración en la búsqueda de flavonoides, así como su ayuda, suministrando reactivos y productos, y discutiendo los resultados.

Los Directores de Departamento a lo largo de estos años me facilitaron en todo momento el acceso a la infraestructura necesaria. Además, el Dr. Carlos Vicente colaboró en la búsqueda de bibliografía sobre las sustancias químicas identificadas.

En esta tesis no se habrían podido ofrecer datos histoquímicos de no ser por la Dra. Alicia Cortella, del Museo Nacional de La Plata (Argentina), profesora visitante en el Departamento, que me enseñó las técnicas fundamentales y, durante sus tres estancias, me brindó siempre su generosa colaboración en cualquier aspecto.

Agradezco a los Dres. Cruz Casas y Víctor Canalís, de Barcelona, la información y las precisas indicaciones que me dieron sobre la localización de *Gr. incurva*, gracias a las cuales conseguí recolectarla. La identificación cierta de *Gr. retracta* fue posible gracias a la amabilidad del Dr. Juan Guerra, que me envió todas las muestras presentes en el Herbario de la Universidad de Murcia.

La asistencia técnica recibida en esta investigación ha sido excepcional. La profesionalidad de D. Miguel Jerez, en el microscopio electrónico de barrido del Real Jardín Botánico de Madrid, y de D. Agustín Fernández y D. Eugenio Baldonado, del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense, han ido más allá de lo que su trabajo les exige, y todos ellos se han implicado personalmente en los problemas investigadores que se precisaba resolver. Resalto el trato especial dispensado por el director del mencionado Centro, el Dr. Carlos Barba, que muy a menudo nos dio prioridad en la utilización del servicio de microscopía. Por esto, y por la preocupación mostrada por los técnicos, su buen hacer y su extremada generosidad con su tiempo, más allá de sus jornadas laborales, ha sido posible la presentación de observaciones sobre ultraestructura, fundamentales en esta tesis.

En la recolección de las especies me han acompañado amigos que no solamente estaban dispuestos a postergar sus planes, madrugar y subirse al monte a por musgos en cualquier condición climatológica; sino que además parecían disfrutar con ello, lo que sorprende siendo casi todos ellos de fuera del mundo de la botánica. A Toño, Quique, Elena, Pili, Humberto, Elisa, Berna y otros que sería largo especificar, muchas gracias.

Durante mis dos estancias en Tenerife, gocé de una cálida acogida, tanto por parte de mis compañeros de laboratorio, como de los investigadores del Departamento de Biología Celular de la Universidad de La Laguna.

Entre éstos, el Dr. Miguel Ángel Pérez Batista, entre otras atenciones, me facilitó el acceso a la biblioteca del Departamento, y me resolvió abundantes consultas sobre la interpretación de los datos ultraestructurales.

La próximamente doctora M<sup>a</sup> del Carmen Alfayate me ofreció su apoyo, su compañerismo y su amistad, consolidada también aquí durante sus visitas a la Universidad Complutense. No olvido tampoco la simpatía y ayuda de su familia. Desde aquí le deseo a Manane toda la suerte del mundo, para el remate de su tesis y para su investigación futura.

Tampoco puedo olvidar la generosidad de Carmina, en cuya casa estuve alojada; y la delicadeza de mis compañeras posteriores, en el C.M.U. Santa María del Pino, que respetaron mis horarios de trabajo y me animaron en los descansos.

Con cariño, debo mencionar a mis compañeros de departamento, a Luis y Miguel (amigos con los que compartí, además, equipo de investigación), Antonio, Elena, Jesús V.; Mari, que tantas veces me echó una mano en las labores más pesadas, Jesús, M<sup>a</sup> Elena, y todos los que contribuyeron a que el tiempo que he pasado aquí sea inolvidable. Especialmente recuerdo a Marta y a Luis, que con su esfuerzo y ayuda hicieron posible la presentación a tiempo de este trabajo.

Otros amigos me dieron ánimo durante el tiempo libre. Entre ellos, Elisa, Antonio, Marisa, Carmen, María, Pedro, Carmen, Benito, y mis compañeros del barrio, en especial los del grupo "Mater Natura".

No puedo olvidar la ayuda de Mercedes Molina, imprescindible en las gestiones para conseguir, contra reloj, presentar y defender esta tesis a tiempo.

Por último, agradezco a mi familia el apoyo constante, material y moral, que se ha plasmado también en contribución directa (mecanografiado del texto, recolecciones, gestiones, etc.).

Que todos ellos, y también aquéllos que imperdonablemente me pasan ahora inadvertidos, crean en mi más profunda gratitud.

# ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| INTRODUCCION . . . . .                          | 1   |
| Anatomía . . . . .                              | 3   |
| Palinología . . . . .                           | 10  |
| Fitoquímica . . . . .                           | 12  |
| MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .                    | 17  |
| Material biológico . . . . .                    | 17  |
| Métodos . . . . .                               | 32  |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN                          |     |
| Anatomía . . . . .                              | 57  |
| <i>Gametófito: Resultados</i> . . . . .         | 57  |
| <i>Gametófito: Discusión</i> . . . . .          | 128 |
| <i>Esporófito: Resultados</i> . . . . .         | 142 |
| <i>Esporófito: Discusión</i> . . . . .          | 194 |
| <i>Zona de transición: Resultados</i> . . . . . | 206 |
| <i>Zona de transición: Discusión</i> . . . . .  | 236 |
| <i>Discusión general</i> . . . . .              | 243 |
| Palinología: Resultados . . . . .               | 251 |
| Palinología: Discusión . . . . .                | 278 |
| Fitoquímica: Resultados . . . . .               | 289 |
| Fitoquímica: Discusión . . . . .                | 323 |
| Discusión general . . . . .                     | 327 |
| CONCLUSIONES . . . . .                          | 335 |
| BIBLIOGRAFÍA . . . . .                          | 339 |

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Los briófitos son una división de plantas arquegoniadas, caracterizada por un ciclo de alternancia de generaciones heteromorfa, en la que el esporófito establece una relación de dependencia con el gametófito, al que está unido durante toda su vida.

Por su organización intermedia entre las algas y las plantas vasculares, se consideran un grupo clave para entender la evolución de los vegetales y la colonización del medio terrestre. Su posible origen mono- o polifilético está en el centro de la controversia acerca de si existió un único antecesor de las plantas verdes, y, dada la presencia de algunos datos que indican su posible relación con las algas de la división Charophyta, especialmente con el orden Charales (Graham & Delviche 1991), de si la colonización del medio terrestre por parte de un hipotético antepasado algal fue realizada en uno o varios eventos.

Sin embargo, muchos aspectos de su biología son aún desconocidos. Por la escasa tradición existente en cuanto a su utilización práctica, y por carecer de los complejos tejidos conductores de plantas vasculares, son a menudo relegados en su estudio, y aparecen en muchas ocasiones con la consideración de "plantas inferiores" o "de escasa diferenciación", cuando se trata de vegetales capaces de desarrollar especializaciones que les permiten sobrevivir en ambientes muy hostiles: regiones polares en las que no aparece ninguna planta, desiertos o rocas expuestas, donde deben soportar rigurosas oscilaciones térmicas y xericidad.

Esta postergación hace que existan pocos protocolos experimentales desarrollados específicamente para briófitos (Duckett et al. 1988), lo que dificulta su estudio, aunque en el pasado algunas técnicas de inclusión en parafina han sido puestas a punto con este material vegetal, debido a la ausencia de tejidos leñosos.

Aún se carece de un inventario completo de las especies de briófitos (más de 25000), y de muy pocas de ellas se dispone de monografías a nivel mundial.

Las revisiones taxonómicas, incluso actualmente, se hacen basándose casi exclusivamente en la morfología externa, lo que no contribuye a contrastar el valor general para el grupo de los estudios estructurales, morfogenéticos o bioquímicos, hasta la fecha muy restringidos en cuanto al número de especies investigadas.

El género *Grimmia*, dentro de los musgos acrocárpicos, elegido para la realización de esta tesis, comprende cerca de 170 especies. Muestran una gran heterogeneidad con respecto a tamaño, diferenciación estructural, morfología externa del filidio, cápsula, perístomas, esporas, etc., lo que ha originado múltiples subdivisiones en subgéneros y secciones (Bruch, Schimper & Gumbel 1845, Schimper 1856, 1860, 1876, Limpricht 1889, Kindberg 1897, Hagen 1909, Loeske 1930). Solamente se conoce un estudio anatómico del género realizado por Kawai (1965). Sin embargo, las principales monografías están basadas en general en datos sobre su morfología externa (Loeske 1930, Deguchi 1978, Cao & Vitt 1986). Por la amplitud de este género, el presente trabajo se ha restringido a la sección *Trichophyllae* B.S.G., caracterizada por un filidio biestrato sólo en su porción apical, un margen plano o recurvado, seta flexuosa o cínea, y cápsulas frecuentemente con costillas presentes en estado deshidratado.



Con el fin de contribuir a su estudio, se han seleccionado caracteres considerados, en principio, relevantes en la biología de estos musgos:

## **ANATOMÍA**

En la biología de briófitos es fundamental la investigación sobre su complejidad estructural y la caracterización de los tejidos, especialmente en musgos acrocárpicos, donde la organización es máxima.

Los primeros autores en poner de manifiesto los distintos tipos celulares de los tejidos briofíticos fueron Schimper (1848), que observó por primera vez la presencia de traza vascular en musgos, Potonié (1883), que definió como "hidroides" las células que la componen, y Tansley & Chick (1901), que señalaron la presencia de otro tipo de células conductoras que denominaron "leptoides". Sin embargo, otros autores también destacables por sus trabajos sobre organografía son Lorentz (1867), Haberlandt (1886), gran estudioso de la anatomía fisiológica vegetal, Vaizey (1888) y Lorch (1894), que investigaron la anatomía y el desarrollo del esporófito, y Goebel (1930), que trabajó sobre briófitos y pteridófitos.

Con respecto al gametófito, más recientemente, Kawai abordó una tipificación de los caulidios de musgos (Kawai & Ikeda 1970, Kawai 1989), basándose en tinciones diferenciales, y encontrando una estrecha correspondencia entre determinados tipos anatómicos y ciertos órdenes de musgos.

En función de sus características fisiológicas y estructurales, destacan los trabajos de Héban t sobre tejidos conductores. El alto valor taxonómico y evolutivo que les concede (Héban t 1965, 1977, 1979) le lleva a ser un pionero del análisis de sus caracteres ultraestructurales (Héban t 1975), con el fin de conocer con mayor detalle las posibles semejanzas entre los distintos grupos de briófitos, así como de éstos con las plantas vasculares.

Asimismo, suponen una aportación los trabajos de Berthier (1972) sobre morfogénesis, y los ultraestructurales de Finocchio (1967), Caputo & Castaldo (1968), Ligrone et al. (1980, 1982a, b), Oliver & Bewley (1984) entre otros. Se reconoce que estos trabajos, especialmente los morfogenéticos, pueden aportar una importante contribución al entendimiento de la sistemática y filogenia de briófitos (Duckett 1986, Duckett & Renzaglia 1988).

Sobre *Grimmia* se conoce tan sólo el trabajo de Kawai (1965), que se refiere a la diferenciación morfológica de los tejidos del caulidio y del filidio, y a la ontogenia de éste.

\* \* \*

Con respecto al esporófito de musgos, las investigaciones realizadas son aún más escasas. Aparte de los primeros estudios ya reseñados, la mayor parte de los trabajos se han llevado a cabo sobre la fisiología del transporte de nutrientes, resumidos por Bopp & Weniger (1971) y Héban t (1977). Sobre anatomía, destacan los trabajos de Wijk (1932), Héban t (1964), Roth (1969), Kawai (1969), y los ultraestructurales de Bassi & Favali (1973), Favali & Gianni (1973, 1975) y Schulz & Wiencke (1976).

Sobre la cápsula, aunque la morfología externa se estudia ampliamente para el diagnóstico taxonómico, no ocurre lo mismo con los caracteres anatómicos. Acerca de éstos, poco se ha aportado desde los estudios de Goebel (1930) o Campbell (1918), con la excepción de la anatomía y estructura del tapete (Paolillo 1969, Mueller 1974, Gambardella et al. 1994). Esta situación contrasta con el gran número de datos acerca del perístoma, que siempre ha sido considerado como un importante carácter para la diferenciación de los grandes grupos de musgos, y, desde los estudios de Philibert (1884-1902), los caracteres del perístoma, al menos a microscopía óptica, se incluyen normalmente en las descripciones de cada especie. Su desarrollo ha sido revisado por Edwards (1984), y su función en la liberación de esporas, discutida en profundidad por Mueller & Neumann (1988). Han sido empleados con fines taxonómicos en Encalyptaceae (Vitt & Hamilton 1974), Fissidentaceae (Bruggeman-Nannenga & Berendsen 1990, Bruggeman-Nannenga & Roos 1990), Ditrichaceae y Dicranaceae (Shaw et al. 1989), Tetrarhizaceae (Shaw & Anderson 1988), y Orthotrichaceae (Vitt 1971, 1981, Lewinsky 1989, Lara et al. 1993).

En *Grimmia*, dada la estabilidad de algunas especies, o su rara fructificación, los estudios sobre anatomía de esporófito son muy escasos, y se limitan a comentarios genéricos sobre el desarrollo de su traza (Lorch 1931) o sobre la diferenciación de tejidos en seta o la morfología de las células del exotecio (Deguchi 1978). Sobre el perístoma, además de las observaciones de Philibert (1884), se conocen algunas anotaciones sobre la ornamentación o el grado de división en las monografías citadas.

\* \* \*

El estudio de la zona de transición es de gran importancia por referirse específicamente a la relación de dependencia permanente del esporófito con respecto al gametófito, característica de briófitos.

En cuanto a los estudios anatómicos referentes a la zona de contacto de ambas generaciones, destacan los de Goebel (1930), Bower (1908) y Haberlandt (1914). Lorch (1925a,b, 1931) fue el primero en señalar la existencia de unas células en la placenta briofítica con gruesos depósitos de material de pared. El trabajo de Blaikley (1933) confirma la naturaleza celulósica de los mismos, y asocia su presencia, además, a la aparición de un denso citoplasma en estas células.

Eymé & Suire (1967) y Maier (1967) publicaron los primeros estudios ultraestructurales sobre estas células, señalando caracteres típicos como abundancia de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso, así como el contorno irregular de los engrosamientos. Roth (1969) realizó diversas observaciones histogenéticas y morfológicas sobre la placenta, y en particular sobre estas células, en varias especies. Pero fueron Gunning et al. (1968) los que les dieron la denominación de células de transferencia, caracterizadas por sus "paredes laberínticas", que consideraron especializadas en transporte a cortas distancias (Gunning et al. 1969) y que ellos estudiaron en primer lugar en vasos floemáticos de hojas de leguminosas, y en nódulos radiculares (Pate et al. 1969). Posteriormente, en la recopilación de Gunning et al. (1974) y en la de Kelley (1969) en hepáticas, se señaló la amplia diversidad de su presencia en embriófitos, tanto en estructuras vegetativas como reproductoras (aunque ellos restringieron su presencia en briófitos tan sólo a la placenta), así como la especificidad taxonómica tanto en su distribución en el organismo vegetal como en la disposición y forma de los engrosamientos dentro de la célula. Posteriormente se ha conocido la existencia de estas células en estructuras vegetativas de briófitos: en el parénquima contiguo a la traza vascular gametofítica (Héban 1970), en el parénquima foliar de *Polytrichum commune* (Scheirer 1983) e incluso en las superficies de callos de cultivo gametofíticos (Lal & Narang, 1985), lo que, junto con trabajos previos de Maier & Maier

(1972) sobre el crecimiento de los engrosamientos al añadir azúcares al medio, parece indicar la influencia de factores ambientales sobre una base genética que permite el desarrollo de estas células.

De gran importancia filogenética puede considerarse el descubrimiento de células de transferencia en el clorófito *Coleochaete orbicularis* (Graham & Wilcox 1983) en las células adyacentes al cigoto, no sólo por ser la primera cita en talófitos, sino por tratarse de una situación en cierto modo equivalente a la placenta briofítica, lo que sugiere la existencia de un antecesor común para ambos grupos vegetales.

Los primeros estudios ultraestructurales, ya reseñados, fueron completados con mayor profundidad por diversos autores. Destacan los de Wiencke & Schulz (1975, 1978), Browning & Gunning (1977, 1979a,b,c), Chauhan & Lal (1980), Caussin et al. (1983), Ligrone et al. (1982a) y Ligrone & Gambardella (1988a,b) sobre características citológicas de las células de transferencia, tales como abundancia de plasmodesmos, subdivisión de la pared en distintas capas y extensión de la pared laberíntica según la localización de las células en la placenta, todo ello en distintas especies de briófitos.

Se sugiere una utilización de los caracteres anatómicos de la vagínula para taxonomía, tanto para grandes grupos (Ligrone & Gambardella 1988a,b) como para niveles genéricos (Vaughn & Hasegawa 1993).

En el género *Grimmia* tan sólo se ha estudiado la morfología externa de la vagínula (Hagen 1909) y la de sus células epidérmicas (Deguchi 1978).

\* \* \*

Una dificultad añadida a los estudios anatómicos en briófitos es la gran confusión terminológica en cuanto a la denominación de los tipos celulares (Héban 1979), y las divergencias en cuanto a la interpretación de la configuración organográfica: así, mientras que Kawai considera casos de especímenes en que colapsa la traza vascular de hidroides, o en que es poco diferenciable (Kawai 1965), Héban (1979) opina que el primer caso se debe a alteraciones sufridas por la desecación en material de herbario, mientras que el segundo no lo admite ni siquiera como posibilidad, al ser para él la distinción entre la traza vascular de hidroides y el parénquima circundante absolutamente tajante, pues éste está formado por células vivas y aquél, por células muertas. Hay que indicar que el glosario más moderno, editado por Magill (1990), cuya terminología se ha seguido en esta tesis (junto con la de Font-Quer 1985), no se pronuncia al respecto, dejando sin zanzar esta divergencia.

La obtención del mayor número posible de datos para ajustar cada vez más las interpretaciones se hace esencial, y aquí cobra importancia la invitación de Héban (1979) a generalizar los estudios ultraestructurales, hasta ahora restringidos a un escaso número de especies.

Por esto, se ha considerado esencial abordar la ultraestructura de las especies de la sección *Trichophyllae* para caracterizar los tejidos presentes en gametófito y esporófito.

Una valiosa ayuda podría venir de las investigaciones histoquímicas, al aportar datos sobre la composición diferencial de los tejidos. No se conocen en briófitos estudios acerca de histoquímica cuantitativa, y muy escasos sobre cualitativa. Se han aplicado con éxito algunas técnicas para averiguar la presencia o ausencia de lignina en sus paredes celulares (Erickson & Miksche 1974), y para caracterizar determinadas células y estructuras: esporófitos (Lal & Chauhan 1982), esporas (Olesen & Mogensen 1978), tejidos conductores (Stevenson 1977, Scheirer 1978, 1980) o pelos secretores (Berthier et al. 1974, Ligrone 1986). Una prueba sencilla, la reacción de medios básicos en las paredes de Pottiaceae, ha sido empleada con fines taxonómicos por Zander (1993).

Dada la ausencia total de estudios histoquímicos en Grimmiaceae, se han seleccionado en esta tesis algunas pruebas encaminadas a la detección de sustancias ergásticas (almidón y lípidos), y de componentes de pared (presencia de ligninas, fenoles, suberinas, celulosa y pectinas).

Los intentos de detección de ligninas se justifican por existir controversia acerca de la capacidad de los briófitos de sintetizarla. Erickson & Miksche (1974), Hébant (1974) y Miksche & Yasuda (1978) informaron de las posibles contaminaciones o errores en trabajos anteriores en los que se afirmaba la presencia de este polímero (Siegel 1962, 1969, Bland et al. 1968). Sin embargo, recientemente se ha demostrado, por técnicas analíticas, la presencia de derivados de lignina en la hepática *Pellia epiphylla* (Downey & Basile 1989).

No se han realizado pruebas para la detección de proteínas dada la alta reacción que las paredes manifestaban en medios básicos, vehículos de los reactivos disponibles. Sin embargo, y en vista de los resultados de Zander (1993), se han incluido pruebas sobre la actuación de medios ácidos y básicos sobre las secciones de las muestras.

Las pruebas histoquímicas realizadas, descritas en el siguiente capítulo, se han seleccionado por su fiabilidad según Hébant (1977), Jensen (1962) y Gahan (1984).

## ESPORAS

A pesar de los trabajos pioneros de Leitgeb (1884), y Roth (1904-1905), las esporas de briófitos no han sido consideradas en un principio como poseedoras de caracteres de marcada importancia. A diferencia del polen de las fanerógamas, presentan patrones de ornamentación que parecen restringirse a un reducido espectro de variabilidad (Saito & Hirohama 1974). Asimismo, dado que su germinación necesita escasos requisitos ambientales, comunes además para esporas de muchos taxones no necesariamente emparentados, el patrón de ornamentación, al contrario que el del grano de polen, no se relaciona con el reconocimiento específico de un sustrato biológico de cuyos estímulos la espora dependa para germinar. Mogensen (1981) lo supone implicado en impedir, mediante interacciones con las fuerzas de tensión superficial, que este proceso se desencadene con cantidades de agua en el medio insuficientes para el desarrollo posterior del protonema, lo que no precisaría de específicas diferencias taxonómicas. Por otra parte, de la misma génesis de la cubierta perínica (por deposición de nanogránulos, con elevada densidad y al azar, sobre la superficie de la espora), no cabe esperar la presencia de una variabilidad debida a la existencia de patrones predefinidos sobre su superficie e intracelularmente controlados, sino tan sólo la causada por la cantidad, el tamaño y la forma de los nanogránulos, así como por la separación final entre los elementos esculturales de la espora madura.

Sin embargo, McClymont (1954) concluyó, sobre observaciones realizadas únicamente con microscopía óptica, que el tamaño, la forma y la ornamentación de la espora eran caracteres potencialmente importantes desde el punto de vista taxonómico y filogenético. Aunque se ha comprobado la influencia de las condiciones ambientales sobre el tamaño y la forma (Reitsma 1969), ambos se consideran significativos al menos en taxones de alto rango. En cuanto a la ornamentación, si bien ya la microscopía óptica consigue en algunos casos diferenciar esporas dentro de un mismo género (Mc Clymont 1955), la introducción del microscopio electrónico de barrido ha permitido mejorar la observación de los caracteres esculturales. Aunque algunos intentos de utilizarlos



taxonómicamente, como los de Castaldo et al. (1981), en *Buxbaumia*, o Sorsa & Koponen (1973), en Mniaceae, no han tenido éxito, han resultado en cambio ser importantes para el diagnóstico en Bartramiaceae (Griffin 1981, 1982, Griffin & Acuña 1983), así como en Encalyptaceae (Vitt & Hamilton 1974), donde además se han establecido correspondencias con otros datos para elaborar hipótesis filogenéticas (Horton 1982).

\* \* \*

Otro carácter relevante es la ultraestructura de la pared y del citoplasma de la espora, observada con microscopio electrónico de transmisión. Aunque existen muy pocos estudios al respecto (especialmente sobre el citoplasma), con estos datos se ha podido, en hepáticas, diferenciar órdenes (Denizot 1976, Neidhart 1979), y, en musgos, independizarlos dentro de los briófitos por presentar una envuelta perínica (Neidhart 1979), así como constatar diversificación tanto en lo que se refiere a la participación de la exina en los elementos esculturales (McClymont & Larson 1964), como con respecto a las peculiaridades de la estratificación de esta capa, que parecen poder caracterizar el grupo de los esfagnos (Brown et al. 1982a, b, Boudier 1989).

\* \* \*

Apenas existen trabajos sobre esporas del género *Grimmia*. Además de las menciones al tamaño y la forma en las descripciones de sus taxones, tan sólo se conocen cuatro publicaciones que incluyen algunas de las especies objeto de la presente tesis. En el atlas de Boros & Jārai-Komlódi (1975) aparecen varias imágenes de *Gr. pulvinata*, obtenidas con microscopía óptica y escasamente comentadas (interpretando la ornamentación como perteneciente a la sexina). En los otros tres trabajos se ofrecen exclusivamente datos sobre morfología externa, procedentes de microscopía óptica y electrónica de barrido, en algunos de estos taxones. Los estudios que aquí se exponen pretenden aportar características de la morfología interna y externa de las esporas de las especies señaladas, con el fin de discutir la variabilidad presente en este grupo en comparación con lo conocido en el resto de los briófitos.

## FITOQUÍMICA

La primera noticia que se tiene acerca de estudios fitoquímicos en briófitos fue dada por Lohmann (1903) en su discurso inaugural de la Universidad de Jena, en el que afirmó que los cuerpos oleosos de algunas hepáticas estaban compuestos por aceites esenciales capaces de inhibir la predación <sup>de</sup> los caracoles. Desde entonces, distintos trabajos han demostrado la gran diversidad de constituyentes químicos que poseen los briófitos, desde compuestos inorgánicos a complicadas moléculas orgánicas (terpenoides o fenólicas).

Muchas estructuras nuevas para la Química se han descrito por primera vez, o de manera exclusiva, en esta División. Un ejemplo reciente lo constituyen los biflavonoides macrocíclicos, encontrados por vez primera por Seeger et al. 1991, o los triflavonoides macrocíclicos, descritos por López Sáez 1994. Además, para comprender la biología de los briófitos, es esencial el estudio del papel que desempeñan estas sustancias en la planta, como reservas nutritivas, como intermediarios de síntesis o degradación de otros compuestos, como acúmulos inactivos para contrarrestar su posible acción tóxica; por su actividad hormonal, por su contribución a las características de la pared celular, o por la protección ante agentes externos abióticos (sequía, congelación, radiaciones, daño mecánico, etc.) o bióticos (depredación o parasitismo).

Las investigaciones fitoquímicas permiten, adicionalmente, numerosas aplicaciones prácticas. Así, los briófitos se han empleado como indicadores de cobre (Persson 1956, Shacklette 1967), en la biomonitorización de trazas de contaminantes (Herrmann 1990), como insecticidas (Asakawa 1988a, b), y en medicina, por su poder antibiótico, antifúngico y antitumoral (Asakawa 1990).

De igual modo, algunas sustancias han mostrado cierta relevancia como marcadores quimiotaxonómicos, así como en la elaboración de hipótesis filogenéticas. Entre ellas se encuentran ácidos grasos, esteroides, terpenoides, y, de modo destacado, flavonoides.

\* \* \*

Dado que las pruebas histoquímicas realizadas en las 10 especies objeto de esta tesis indicaron la abundancia de sustancias fenólicas en las paredes celulares, y de acúmulos lipídicos en el citoplasma, se consideró de gran interés abordar el análisis fitoquímico, prestando especial atención a la presencia de flavonoides y compuestos lipídicos, con el fin de discutir el papel biológico de las sustancias encontradas en el conjunto del grupo.

El estudio de los flavonoides en briófitos tiene interés desde varios puntos de vista. En primer lugar, biológico, puesto que, aunque hasta la fecha no se sabe con certeza qué función desempeñan en este grupo vegetal, se ha apuntado la posibilidad de que contribuyan al refuerzo de las paredes celulósicas (lo que sugiere su semejanza biogenética con la lignina), de que desempeñen un papel regulador como inhibidores del transporte de auxinas (Jacobs & Rubery 1988), de que actúen como filtro químico ante la luz ultravioleta (Stafford 1990) o de que, por su poder antibiótico (Van Hoof et al. 1981, Spilkova & Hubik 1988, 1992), lleven a cabo una misión defensiva, lo que a su vez abre un interesante campo de investigación aplicada. En segundo lugar, taxonómico: por su relativa estabilidad y facilidad de extracción y aislamiento han sido muy utilizados en quimiotaxonomía. La presencia exclusiva de tricetinas-di-C-glicosiladas en hepáticas, y de biflavonoides en musgos, ha permitido separar estos grupos del resto de los briófitos, y, en musgos, a pesar del escaso número de especies sometidas a una investigación exhaustiva, los flavonoides parecen probar su utilidad sobre todo en el diagnóstico de taxones infragenéricos (Markham et al. 1976, López Sáez 1994). En tercer lugar, filogenético: sin duda, la relación que la planta establece con el entorno a través de ellos es resultado de un proceso evolutivo. Estos compuestos aparecen en todos los grupos de embriófitos, pero no en algas, con la señalada excepción del género *Nitella* en Charophyta (Markham & Porter 1969), lo que hace pensar en un origen común para estas algas y para las plantas terrestres.

Los flavonoides sólo han sido estructuralmente dilucidados en tres especies de Grimmiaceae: *Racomitrium lanuginosum* (Geiger et al. 1988, Seeger 1992), *R. ptychophyllum* y *Grimmia ovalis* (Seeger 1992), en las que se han hallado biflavonoides. Además, se ha investigado la presencia de estas sustancias en *R. aciculare* y *R. heterostichum*, donde se ha postulado la presencia de biflavonoides (Ron et al. 1990), en *Gr. torquata*, en la que se han detectado flavonoides en general (McClure & Miller 1967), en *Gr. orbicularis*, donde se ha sugerido la presencia de un flavonol (Estébanez 1991), y en *Gr. hartmanii*, donde sólo se ha descrito la ausencia de proantocianidinas (Bendz et al. 1966).

En cuanto a los lípidos, la inmensa mayoría de los trabajos han tenido como objeto las hepáticas, por presentar cuerpos oleosos y por la actividad biológica demostrada de las sustancias extraídas, especialmente terpenoides (Asakawa 1990). En musgos, los lípidos han sido escasamente estudiados. Huneck (1983), en su revisión de los trabajos publicados hasta la fecha, indica la frecuente presencia de ácidos grasos de 14 a 22 átomos de carbono, con distintos grados de insaturación; de hidrocarburos alifáticos, con predominio de los de número de átomos de carbono impar, de escasos terpenos (un solo diterpeno y nueve triterpenos) y de 11 esteroides. Destaca el bajo número de especies estudiadas (no más de 55 para cada tipo de compuestos). Los trabajos posteriores no añaden nuevos compuestos extraídos de musgos a esta lista.

Entre los ácidos grasos, son especialmente notables, por no aparecer apenas en otros grupos vegetales, los ácidos eicosanoico y araquidónico. Este último, además, es relevante por ser precursor de prostaglandinas, de elevada actividad biológica.

Algunos autores han dado importancia taxonómica a la distribución de ácidos grasos acetilénicos (Kohn et al. 1987), o a los patrones presentados de ácidos grasos totales (Karunen 1990), así como significado evolutivo a la proporción de los poliénicos de 20-22 átomos de carbono frente a los de 16-18 (Karunen 1982). Sin embargo, en la mayor parte de los trabajos se considera la variación de sus cantidades en relación con diversas etapas o fases de su ciclo vital (Karunen et al. 1979, Al-Hasan et al. 1990). Tan sólo *Racomitrium canescens* var. *ericoides* y *R. lanuginosum* (Anderson et al. 1974, Catalano et al. 1976) representan a la familia Grimmiaceae entre las especies estudiadas.

Por su parte, los terpenos han sido estudiados exclusivamente en 19 especies de musgos, ninguna de ellas perteneciente a Grimmiaceae, y se cuestiona en algunas la procedencia de los triterpenos de una contaminación del sustrato (Herout 1990). Aunque en helechos parecen prometedores marcadores quimiotaxonómicos (Asakawa 1986), y se ha comprobado su efecto anti-depredador en plantas vasculares y hepáticas (Herout 1990), apenas existen estudios sobre su papel y significación en musgos, si bien se señala que su presencia en éstos, al igual que en helechos, y su ocasional hallazgo en hepáticas y algas puede deberse a relaciones de parentesco entre estos grupos (Asakawa 1986).

Asimismo, en cuanto a los esteroides, sólo han sido analizadas 55 especies de musgos, de donde se han obtenido 11 compuestos (Huneck 1983, Patterson et al. 1990, Matsuo & Sato 1991). A este respecto sólo se conocen datos de *Racomitrium lanuginosum*, dentro de Grimmiaceae (Huneck et al. 1973, Catalano et al. 1976). Los autores de estos trabajos subrayan la ausencia de estudios sobre el papel que estos compuestos desempeñan en musgos, aunque se piensa en uno semejante al que realizan en plantas vasculares: hormonal, defensivo (Herout 1990) o indirectamente fotomorfogénico, al asociarse a lipoproteínas relacionadas con el fitocromo (Lamparter et al. 1992). Se ha propuesto que la composición en esteroides de un vegetal es reflejo de su posición taxonómica (Patterson et al. 1990). Los datos en briófitos no parecen suficientes para hacer esta valoración, pero, con respecto a la estereoquímica de C-24, se apunta que, teniendo en cuenta que en algas se encuentran solamente epímeros  $\beta$ , y en plantas vasculares un gran predominio de epímeros  $\alpha$ , la presencia en briófitos de ambos epímeros ( $24\alpha$  y  $24\beta$ ) podría apoyar la hipótesis de la posición intermedia de este grupo entre los dos anteriores (Patterson et al. 1990).

\* \* \*

No se debe perder de vista que el estudio de los compuestos químicos que produce un organismo es al tiempo un examen de su expresión genética, y que el conocimiento de la información hereditaria es el dato más fiable a la hora de interpretar relaciones de parentesco, y al que intentan aproximarse todos los restantes estudios.

\* \* \* \* \*

En esta tesis se pretende, en suma, la caracterización histoquímica, anatómica y ultraestructural de los tejidos del esporófito y del gametófito<sup>1</sup>, el estudio morfológico externo e interno de las esporas, y una aproximación al análisis fitoquímico de la especies españolas de la sección *Trichophyllae* del género *Grimmia*.

---

<sup>1</sup> Con un análisis somero del filidio, en vista de la abundancia de datos sobre su morfología, diferenciación estructural y ontogenia que aparecen en las distintas monografías reseñadas y en el trabajo de Kawai (1965).

## MATERIAL Y MÉTODOS

## MATERIAL BIOLÓGICO

La sección *Trichophyllae* B. S. G. del género *Grimmia*, según es interpretada por Corley et al. (1981), consta de 12 especies en Europa e Islas Azores. De ellas, siguiendo a Casas (1991), se citan a continuación las que están presentes en la flora briológica española:

*Grimmia anomala* Hampe ex Schimp.

*Grimmia decipiens* (Schultz) Lindb.

*Grimmia elatior* Bruch ex Bals. & De Not.

*Grimmia hartmanii* Schimp.

*Grimmia funalis* (Schwaegr.) B. S. G.

*Grimmia incurva* Schwaegr.

*Grimmia orbicularis* Bruch ex Wils.

*Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm.

*Grimmia retracta* Stirt.

*Grimmia torquata* Grev.

*Grimmia trichophylla* Grev.

De la presente tesis se ha excluido *Grimmia anomala* Hampe ex Schimp., por no haber sido encontrada en las dos únicas localidades en que esta especie está citada en España: Espinama, Santander (Allorge 1928), y el Alto Valle del Ter, Lérida (Lloret 1989).

Se describen más adelante las especies que constituyen el objeto del presente estudio. Se han utilizado para ello los datos que recogen tanto las descripciones originales de cada especie como las siguientes floras y monografías: Husnot (1884-1890), Loeske (1930), Jones (1933), Nyholm (1956), Smith (1978), Deguchi (1978), Crum & Anderson (1981) y Cao & Vitt (1986). Sólo se han reseñado las sinonimias correspondientes a los basónimos.



*Grimmia decipiens* (F. Schultz) Lindb. in C.J. Hartman, 1861  
(= *Trichostomum decipiens* Schultz, Fl. Starg. Suppl. 1819).

Autoica. Plantas de 1-2'5(-4) cm, en pulvínulos incanos que se desintegran fácilmente.

Filidios laxamente adpresos cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, de lanceolados a anchamente lanceolados, que se adelgazan hacia una punta aguda; ápice y margen biestratosos; margen recurvado; pelo tan largo como la lámina en los filidios superiores, muy dentado, decurrente por el margen en el ápice del filidio; nervio que termina en el ápice; células basales estrechamente rectangulares, hasta 10 veces más largas que anchas, rectas o ligeramente sinuosas, las marginales más cortas, hialinas, con paredes transversales engrosadas, y que forman una zona marginal conspicua; las superiores son de rectangulares a cuadradas, muy sinuosas, paquidermas, de 7-10  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del limbo.

Seta arqueada cuando húmeda, flexuosa cuando seca.

Cápsula elipsoide, estriada.

-----  
Opérculo cónico, subulado, recto.

Perístoma rojo, dientes bi-trífidos, muy papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base.

Esporas de 12-14  $\mu\text{m}$ .

Fructificación frecuente.

*Grimmia elatior* Bruch ex Bals. & De Not., Mem. R. Acc. Sc. Torino, 1838.

Dioica. Plantas de hasta 7 cm, pulviniformes, oscuras.

Filidios laxamente adpresos cuando secos, de erecto-patentes a patentes cuando húmedos, estrechamente lanceolados desde una base ancha; un margen muy revoluto y el otro menos (o plano), biestratoso y opaco hacia el ápice; pelo liso o ligeramente denticulado, de hasta 1/2 de la longitud de la lámina; el nervio termina en el ápice; células basales de rectangulares a lineares, sinuosas, paquidermas, hacia el margen son de rectangulares a cuadradas con paredes transversales engrosadas, las de la fila marginal más largas, las superiores de irregularmente cuadradas a redondeado-hexagonales, muy sinuosas, paquidermas, papilosas, de 8-10  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del limbo.

Seta arqueada cuando húmeda, flexuosa cuando seca.

Cápsula elipsoide.

Opérculo cónico-rostrado, erecto.

Perístoma rojo vivo, dientes bi-trífidos, ligeramente papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base.

Esporas de hasta 15  $\mu\text{m}$ .

Fructificación rara.

*Grimmia funalis* (Schwaegr.) B. S. G., 1845.

(= *Trichostomum funale* Schwaegr., Sp. Musc. Supp. 1(1). 1811).

Dioica. Plantas (1-)2 -4 cm, en densos pulvínulos grisáceos.

Filidios adpresos, contorneados en espiral cuando secos dando un aspecto juláceo, lanceolados; margen recurvado; pelo ligeramente rugoso, 1/2-1 vez tan largo como la lámina en los filidios superiores; nervio fuerte en la base, más débil hacia el ápice, donde termina; células basales estrechas, hasta 10 veces más largas que anchas, sinuosas, paquidermas, más cortas en la base junto al nervio, cuadrado-rectangulares hacia el margen, más alargadas y hialinas en 1-2 filas marginales, las superiores de cuadrado-rectangulares a cuadradas, sinuosas, pelúcidas, de 10 µm de anchura en la mitad del limbo.

Seta arqueada.

Cápsula ovoide, a menudo escondida entre los pelos de las hojas periqueciales.

Opérculo cónico, mamilado.

Perístoma rojo, dientes bífidos en la mitad superior, con ramas desiguales, papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada.

Esporas de 16-18 µm.

Fructificación ocasional.

*Grimmia hartmanii* Schimp., Syn., 1860.

Dioica. Plantas de (0'5-)1 - 4(-6) cm, cespitosas, verdoso-amarillentas.

Filidios ligeramente contortos y a menudo de ápices secundos cuando secos, patentes o recurvados y frecuentemente secundos cuando húmedos, lanceolados, que se adelgazan hacia una punta aguda; margen biestratoso en la zona superior, uno o los dos márgenes recurvados en la base; pelo corto, de 40-320 (-500)  $\mu\text{m}$  de longitud en los filidios superiores (rara vez más largos); nervio fuerte que termina en la punta; células basales 3-6 veces más largas que anchas, más o menos sinuosas y paquidermas, más cortas hacia el margen, las superiores cuadradas, generalmente sinuosas, paquidermas, de 8-12  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del filidio.

Propágulos pardos, pluricelulares, globosos, de hasta 250  $\mu\text{m}$  de diámetro, dispuestos en grupos en los extremos de filidios malformados.

Seta curvada.

Cápsula ovoide.

Opérculo rostrado.

Perístoma rojizo, dientes ligeros o totalmente perforados en el ápice, ligeramente papilosos.

Caliptra cuculado-mitriforme.

Esporas de 12-13  $\mu\text{m}$ .

Fructificación muy rara.

*Grimmia incurva* Schwaegr., Suppl. I, 1811.

Dioicas. Plantas de 1-2'5 cm, cespitosas, pulviniformes, con ramas erectas, fastigiadas, verdosas por arriba y negruzcas por debajo.

Filidios crespos cuando secos, patentes cuando húmedos, lineares o a veces linear-lanceolados; margen y ápice biestratosos; ápice agudo, margen plano o ligeramente recurvado; pelo muy corto en los filidios superiores (hasta 120  $\mu\text{m}$ ) y ausente en los inferiores; nervio muy fuerte, que termina en o bajo el ápice; células basales leptodermas, hialinas, firmes, hasta 6 veces más largas que anchas, más o menos uniformes hacia el margen, las superiores cuadradas, firmes, de 10-12  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del filidio.

Seta curvada.

Cápsula inmersa entre los filidios periqueciales, oval-elipsoide, lisa, parduzco-amarillenta.

Opérculo cónico, obtuso, que iguala la mitad de la longitud de la urna, rojo en la base y parduzco-amarillento en el ápice.

Perístoma con dientes amarillento-rojizos, lanceolados, erectos, perforados, trabeculados y papilosos.

Caliptra mitriforme, subulada, a veces hendida en la base y con pelos parduzco-amarillentos.

Esporas de hasta 15  $\mu\text{m}$ .

Fructificación rara.

*Grimmia orbicularis* Bruch in Wils., Eng. Bot. Suppl., 1844.

Autoica. Plantas de hasta 4 cm, pulviniformes, oscuras e incanas.

Filidios erectos, adpresos cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, los superiores de lanceolado a oval-lanceolados; abruptamente prolongados en un pelo rugoso, de 1/2 - 1(-2) veces la longitud de la lámina en los filidios superiores; margen uniestratoso o, a veces, biestratoso sólo cerca del ápice; células basales estrechamente rectangulares, hasta 8 veces más largas que anchas, ligeramente sinuosas, más cortas y hialinas hacia el margen, de 10-12 µm de anchura en la mitad del limbo.

Seta curvada cuando húmeda, erecto-flexuosa cuando seca.

Cápsula de subesférica a ovoide, rara vez ovado-elipsoide.

Opérculo mamilado, obtuso.

Perístoma rojo-amarillento de dientes bi-trífidos, ligeramente papilosos.

Caliptra cuculada.

Esporas de 10-14 µm.

Fructificación frecuente.

*Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm., Eng. Bot. 1807.

(*Fissidens pulvinatus* Timm ex Hedw., Spec. Musc. 1801.

Autoica. Plantas de hasta 3 cm, en densos pulvínulos incanos.

Filidios erectos, adpresos cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, los superiores de lanceolados a oval-lanceolados; abruptamente prolongados en un pelo rugoso de 1/2 - 1(-2) veces la longitud de la lámina en los filidios superiores; margen recurvado, biestratoso en la zona superior; células basales  $\pm$  rectangulares, sinuosas, 2-4 veces más largas que anchas, más largas hacia el nervio, células superiores de cuadradas a cuadrado-rectangulares, paquidermas, sinuosas, pelúcidas, de 7-10  $\mu$ m de anchura en la mitad del filidio.

Seta curvada cuando húmeda, erecto-flexuosa cuando seca.

Cápsula ovado-elipsoide, estriada.

Opérculo rostelado o rostrado, agudo.

Perístoma con dientes pequeños, rojos, transversalmente estriados, bífidos, papilosos.

Caliptra mitriforme, hendida solamente en la base.

Esporas de 8-12  $\mu$ m.

Fructificación frecuente.

*Grimmia retracta* Stirt., Scot. Nat., 1866.

Plantas de 1-3(-3'5) cm, pulviniformes, verdinegras.

Filidios laxamente adpresos cuando secos, escuarrosos o recurvados (pero no secundos) cuando húmedos; lanceolados u oval-lanceolados, que se adelgazan hacia un ápice agudo u obtuso; margen recurvado en la base, biestratoso en el ápice; pelo corto, de 40-240(-500)  $\mu\text{m}$  en los filidios superiores; células basales hialinas, 3-4 veces más largas que anchas, lisas o ligeramente sinuosas, más cortas hacia el margen; las superiores cuadradas o más anchas que largas, de 8-10  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del limbo.

Ni fructificación ni propágulos conocidos.



*Grimmia torquata* Hornsch. in Grev., Scot. Crypt., 1826.

Dioicas. Plantas de 1-5 cm, en pulvínulos pardos a menudo tumescentes.

Filidios crespo-espiralados cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, estrechamente oblongo-lanceolados, agudos; margen recurvado en uno o los dos lados; pelo corto, de hasta 250  $\mu\text{m}$  de longitud en los filidios superiores, muy rara vez más largo, liso; nervio que se adelgaza desde una base fuerte, y que terminan en o bajo el ápice; células basales rectangulares, hasta 6 veces más largas que anchas, paquidermas, sinuosas, uniformes excepto 1-2 filas marginales, leptodermas y hialinas, las superiores de cuadrado-rectangulares a cuadradas, paquidermas, sinuosas, pelúcidas, de 8-10  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del filidio, las marginales de la zona superior a menudo más cortas que las restantes.

Propágulos pardos, multicelulares, de 40-120  $\mu\text{m}$  de diámetro, a menudo presentes en el dorso de los filidios superiores.

Seta arqueada.

Cápsula cilíndrica.

Opérculo rostrado.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base.

Perístoma de dientes mal desarrollados, amarillo-rojizos, irregularmente divididos, papilosos.

Esporas de 9-11  $\mu\text{m}$ .

Fructificación muy rara.

*Grimmia trichophylla* Grev., Fl. Edin., 1824.

Dioicas. Plantas de hasta 3'5 cm, cespitosas, ramificadas, incanas.

Filidios laxamente adpresos, rectos o ligeramente retorcidos cuando secos, de erecto-patentes a esquarrosos cuando húmedos, de lanceolados a estrechamente lanceolados, que se adelgazan hacia un ápice agudo, estrechados o no en la inserción; margen recurvado en la zona inferior en uno o en ambos lados; pelo de hasta 3/4 de la longitud de la lámina en los filidios superiores, de liso a denticulado o espinuloso, muy rara vez ausente; células basales rectangulares, 6(-8) veces más largas que anchas, rectas o sinuosas, células superiores más o menos cuadradas, de rectas a sinuosas, paquidermas, 8-10  $\mu\text{m}$  de anchura en la mitad del filidio.

Yemas de forma irregular, de hasta 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, a veces presentes en la faz del filidio.

Seta arqueada cuando húmeda, erecto-flexuosa cuando seca, de hasta 6 mm de longitud.

Cápsula ovoide o elipsoide, de amarillenta a parduzco-rojiza, estriada.

/5

Opérculo rojo, rostrado, que iguala la mitad de la longitud de la urna.

Perístoma de 16 dientes anaranjados, equidistantes, perforados y a veces ligeramente hendidos en el ápice, papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base, a veces hendida de un lado y oblicua.

Esporas de 10-14  $\mu\text{m}$ .

Fructificación frecuente.

Los especímenes estudiados corresponden a las siguientes recolecciones:

*Grimmia decipiens* (Schultz) Lindb.

**Madrid**, 30TVL351251 "Canencia, Puerto de Canencia, 1500 m", *Estébanez & Ron*, 28-IV-1992, MACB 52514. 30TVL239129 "Manzanares El Real, La Pedriza, 1100 m", *Abella, Alcalde & Estébanez*, 4-VI-1992, MACB 52515.

*Grimmia elatior* Bruch ex Bals. & De Not.

**Huesca**, 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 27-I-1994, MACB 52513. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 21-V-1994, MACB 52512. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 10-VII-1994, MACB 52511.

*Grimmia hartmanii* Schimp.

**Lérida**, 31TCH119279 "Viella, Pla de la Artiga, Artiga de Lin, 1500 m", *Estébanez & Ron*, 4-VII-1993, MACB 52506.

*Grimmia funalis* (Schwaegr.) B.S.G.

**Huesca**, 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 27-I-1994, MACB 52509. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 21-V-1994, MACB 52510. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 10-VII-1994, MACB 52508. **Lérida**, 31TCH246240 "Alto Arán, Valartiés, 1580 m", *Estébanez & Ron*, 5-VII-1993, MACB 52507.

*Grimmia incurva* Schwaegr.

**Lérida**, 31TCH115224 "Viella, Tuc de Molières, 3000 m", *Estébanez*, 15-VIII-1994, MACB 52505.

*Grimmia orbicularis* Bruch ex Wils.

**Cuenca**, 30TWK721893 "Beteta, Hoz de Beteta, 950 m", *Estébanez*, 28-IV-1990, MACB 52501. **Granada**, 30SVG494063 "La Zubia, 1000 m", *Estébanez*, 8-XII-1990, MACB 52500. **Madrid**, 30TVK648598 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 680 m", *Estébanez*, 17-V-1990, MACB 52499. 30TVK648598 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 680 m", *Estébanez*, 12-I-1991, MACB 52503. 30TVL629261 "Patones, Pontón de la Oliva, 760 m", *Estébanez*, 27-III-1993, MACB 52504. **Huesca**, 30TYN249358 "Panticosa, carretera al Balneario, 1450 m", *Estébanez*, 27-I-1994, MACB 52498. 30TYN249358 "Panticosa, carretera al Balneario, 1450 m", *Estébanez*, 21-V-1994, MACB 52502.

*Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm.

**Granada**, 30SVG494063 "La Zubia, 1000 m", *Estébanez*, 8-XII-1990, MACB 52493. **Madrid**, 30TVK646613 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 660 m", *Estébanez*, 24-I-1992, MACB 52497. 30TVK646613 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 660 m", *Estébanez*, 25-I-1993, MACB 52496. 30TVK162985 "Villalba, 900 m", *Estébanez*, 8-IV-1992, MACB 52495. 30TVK162985 "Villalba, 900 m", *Estébanez*, 29-XII-1992, MACB 52494.

*Grimmia retracta* Stirt.

**Albacete**, 30SWH227715 "Alcaraz, Cerro de las Pilas Verdes, 1100 m", *Estébanez*, 29-VIII-1994, MACB 52492.

*Grimmia torquata* Grev.

**Granada**, 30SVG705047 "Güéjar-Sierra, Valle del Genil, Camino de la Estrella, 2300 m", *Estébanez*, 6-XII-1993, MACB 52491.

*Grimmia trichophylla* Grev.

**Ávila**, 30TUK291654 "Villarejo del Valle, Puerto del Pico, 1370 m", *Estébanez & Ron*, 1-IV-1993, MACB 52486. 30TUK278622 "Cuevas del Valle, desvío a El Arenal, 1160 m", *Estébanez & Ron*, 1-IV-1993, MACB 52489. 30TUK291654 "Villarejo del Valle, Puerto del Pico, 1370 m", *Estébanez*, 1-VII-1993, MACB 52485. 30TUK278622 "Cuevas del Valle, desvío a El Arenal, 1160 m", *Estébanez*, 1-VII-1993, MACB 52487. 30TUK291654 "Villarejo del Valle, Puerto del Pico, 1370 m", *Estébanez*, 13-VII-1994, MACB 52484. 30TUK278622 "Cuevas del Valle, desvío a El Arenal, 1160 m", *Estébanez*, 13-VII-1994, MACB 52490. **Madrid**, 30TVL465248 "La Cabrera, 1350 m", *Estébanez & Ron*, 14-VII-1992, MACB 52488.

No se han hallado ejemplares fructificados de cuatro especies. *Gr. retracta* sólo se conoce en estado estéril. *Gr. hartmanii* y *Gr. torquata* son de fructificación muy rara, sin que en España se hayan recolectado muestras fértiles. *Gr. incurva* es una especie muy escasa en la Península Ibérica. El autor de las únicas citas españolas la ha encontrado siempre en estado estéril (V. Canalís, com. pers.). Por este motivo, sólo el caulidio, el filidio y, en su caso, las yemas de estas cuatro especies han sido examinadas en la presente investigación.

En cuanto al estado de desarrollo de los especímenes examinados, es como se indica:

- Las esporas y perístomas han sido obtenidos de cápsulas completamente maduras y abiertas, y las medidas del diámetro máximo se han tomado sobre 80 esporas de cada especie, totalmente hidratadas

- Las setas, cápsulas y zonas de transición, a menos que se indique expresamente el empleo de otras fases, se han analizado en el momento en que la cápsula había alcanzado su máximo tamaño sin haber comenzado a amarillear (fases tempranas de la esporogénesis). De la seta se ha elegido su porción proximal para su estudio con microscopía electrónica de transmisión.

- Los filidios observados habían completado su desarrollo y, salvo especificación contraria, no habían entrado en senescencia; por su parte, los caulidios han sido examinados desde la base hasta el ápice, comprendiendo así toda su variación ontogenética. Debe observarse, sin embargo, que es muy probable que las distintas recolecciones empleadas no cubran la variabilidad fenológica de la planta, lo que ha de tenerse en cuenta especialmente en la discusión de los resultados acerca de actividad celular, cantidad de sustancias de reserva y presencia relativa de componentes de pared.

## MÉTODOS

Una vez recolectado el material biológico, si el análisis no había de ser inmediato, se emplearon los sistemas de conservación que más abajo se indican. El primero de ellos se utilizó para el material destinado al estudio fitoquímico, los dos restantes, para los especímenes que habían de ser objeto del examen estructural e histoquímico. Como control de las posibles modificaciones estructurales originadas por estos tratamientos, se ha examinado *in vivo* material de todas las especies.

### **a. Congelación.**

Este sistema ha sido utilizado con el fin de preservar los compuestos fitoquímicos durante el almacenamiento prolongado del material. Se ha llevado a cabo en un congelador Ignis \*\*\* a -18° C.

### **b. Secado al aire y almacenamiento en sobres de papel.**

Se ha comprobado que muchos briófitos, y en particular los musgos pertenecientes a este género, tras permanecer largos períodos de tiempo en estado deshidratado, son capaces de volver a la vida activa al rehidratarse. Así, Allorge (1947) estima que *Gr. decipiens* retiene su viabilidad durante más de 18 meses, y *Gr. elatior*, entre 70 meses y 6 años, y Keever (1957) informa de una duración de 7-10 años de la vida latente de *Gr. laevigata* en herbario. Asimismo, a lo largo de esta experimentación no se han apreciado modificaciones en sus caracteres anatómicos con respecto al material analizado en fresco. Por estos motivos, éste ha sido el método más empleado para conservar los especímenes procedentes de las distintas recolecciones. La rehidratación del material, requisito previo al examen anatómico, se ha conseguido tras su inmersión durante un mínimo de 12 horas en agua con una gota de jabón líquido como emoliente. La adición de jabón se ha suprimido en el caso de que los lípidos se constituyeran en objeto de estudio, para evitar su emulsión y pérdida en los tejidos.

**c. Fijación en FAA o FPA.**

Ha sido una técnica empleada en tres circunstancias: sobre muestras que no iban a ser examinadas a corto plazo y en las que se quería evitar que maduraran sobrepasando una etapa concreta del desarrollo (fenómeno que se ha observado repetidamente a lo largo de esta experimentación en los otros métodos de almacenamiento), en el caso de desear un endurecimiento del material para dificultar su disgregación en la obtención de secciones y, por último y principalmente, para preservar sus estructuras, tanto a lo largo del proceso de obtención de cortes a congelación como durante el protocolo de deshidratación, inclusión en parafina, corte, desparafinado y rehidratación. El material puede conservarse durante meses sumergido en la solución fijadora. Las muestras, completamente hidratadas tras 12 horas de inmersión en agua, y troceadas en piezas de dimensión máxima inferior a 3 mm, han sido sometidas al siguiente procedimiento de fijación:

- . solución fijadora (FAA o FPA) ..... 4 horas (mínimo)
- . agua ..... lavado de 10-15 minutos



La composición por cada 100 ml de las soluciones fijadoras empleadas es la que a continuación se indica:

FAA (formaldehído-ácido acético-alcohol), según Jensen (1962):

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| etanol 50°            | 90 ml |
| ácido acético glacial | 5 ml  |
| formaldehído 40%      | 5 ml  |

FPA (formaldehído-ácido propiónico-alcohol), según Johansen (1940):

|                  |       |
|------------------|-------|
| etanol 50°       | 90 ml |
| ácido propiónico | 5 ml  |
| formaldehído 40% | 5 ml  |

.....

Ambas, pero especialmente la segunda, son recomendadas por los autores respectivamente citados para especímenes delicados, con referencia expresa a los briófitos.

## Anatomía y palinología

### 1. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido:

El material de partida fue usado indistintamente fresco o bien tras su secado al aire. En ambos casos se rehidrató por inmersión en agua durante 12 horas. El protocolo posterior que se ha seguido es el recomendado por Carrión et al. (1990).

#### 1.1. Fijación:

- . glutaraldehído (3%) en  
tampón cacodilato<sup>1</sup> 0,1 M ..... 2 baños de 1 hora
  
- . sacarosa (3%) en tampón  
cacodilato 0,1 M ..... lavado (mínimo: 3 horas)

---

<sup>1</sup> La preparación de las distintas soluciones en tampón cacodilato fue facilitada partiendo de una solución-base 0,2 M, que se obtuvo disolviendo 4,28 g de cacodilato sódico trihidratado en 100 ml de agua destilada, y ajustando el pH a valores entre 7,2 y 7,4 con una gota de HCl puro.

## **1.2. Deshidratación:**

|                                     |                      |
|-------------------------------------|----------------------|
| . acetona <sup>2</sup> de 30° ..... | 1 baño de 10 minutos |
| . acetona <sup>2</sup> de 50° ..... | 1 baño de 10 minutos |
| . acetona <sup>2</sup> de 70° ..... | 1 baño de 10 minutos |
| . acetona <sup>2</sup> de 96° ..... | 1 baño de 10 minutos |
| . acetona de 100° .....             | 1 baño de 10 minutos |

## **1.3. Secado a punto crítico y metalización:**

Las muestras fueron transferidas al aparato de secado a punto crítico en acetona, luego ésta fue sustituida por dióxido de carbono líquido, que fue eliminado tras alcanzar su punto crítico, con lo que se minimizó la deformación producida por fuerzas de tensión superficial.

Inmediatamente al secado, las muestras fueron colocadas en portas impregnados de adhesivo de plata coloidal y, seguidamente, metalizadas con oro puro, quedando recubiertas por una capa de 150-200 Å.

---

<sup>2</sup> En tampón cacodilato 0,1 M.

## 2. Obtención de cortes semifinos y ultrafinos:

Se ha partido de material fresco u, ocasionalmente, secado al aire. En ambos casos se ha asegurado su rehidratación sumergiéndolo en agua durante al menos 12 horas y eligiendo las muestras que se encontraban, pasado ese tiempo, en el fondo del recipiente. Seguidamente se cortaron en piezas de dimensión máxima inferior a 2 mm.

### 2.1. Fijación:

- . glutaraldehído (3%)  
en tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 baños de 1 hora
- . tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 lavados de 30 minutos
- . tetróxido de osmio (1%)  
en tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 baños de 1 hora
- . tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 lavados de 30 minutos

En el primer paso las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos para facilitar la rápida penetración del fijador, así como la desgasificación de los tejidos.

## **2.2. Deshidratación del material:**

|                              |                      |
|------------------------------|----------------------|
| . etanol <sup>3</sup> de 30° | 1 baño de 10 minutos |
| . etanol <sup>3</sup> de 50° | 1 baño de 10 minutos |
| . etanol <sup>3</sup> de 70° | 1 baño de 10 minutos |
| . etanol <sup>3</sup> de 96° | 1 baño de 10 minutos |
| . etanol absoluto            | 1 baño de 10 minutos |

## **2.3. Inclusión en resina EPON 812<sup>4</sup>:**

|                          |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| . etanol : acetona (1:1) | 2 baños de 15 minutos |
| . acetona                | 2 baños de 15 minutos |
| . acetona : resina (2:1) | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (1:1) | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (1:2) | 1 baño de 1 hora      |
| . resina                 | 1 baño de una noche   |

---

<sup>3</sup> En tampón cacodilato 0,1 M.

<sup>4</sup> Comercializada por la casa Serva

El procedimiento descrito ha dado en general buenos resultados. Sin embargo, algunas muestras especialmente problemáticas han precisado un proceso de inclusión más gradual y prolongado en resina:

|                                    |                       |
|------------------------------------|-----------------------|
| . etanol : acetona (1:1) . . . . . | 2 baños de 15 minutos |
| . acetona . . . . .                | 2 baños de 15 minutos |
| . acetona : resina (3:1) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (2:1) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (3:2) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (1:1) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (2:3) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (1:2) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . acetona : resina (1:3) . . . . . | 1 baño de 1 hora      |
| . resina . . . . .                 | 1 baño de una noche   |

En ambos casos, los pasos en los que se emplea resina se realizaron en oscuridad (a temperatura ambiente), para evitar la fotopolimerización de la misma.

Los bloques definitivos fueron obtenidos poniendo resina nueva en moldes de silicona, transfiriendo a ellos las muestras y orientando éstas convenientemente. Se dejaron polimerizar durante 72 horas en estufa a 70° C.

#### **2.4. Corte de las muestras:**

Se ha empleado un ultramicrotomo Reichert-Jung, con cuchilla de cristal para conseguir cortes semifinos (0,5-1 µm) o de diamante para obtener secciones ultrafinas (70-90 nm).

## **2.5. Tinción y conservación de los cortes:**

Los cortes semifinos fueron colocados en un porta, puestos a secar unos minutos en estufa a 80° C hasta quedar adheridos a éste y, posteriormente, teñidos durante 1 minuto a esa temperatura con azul de metileno de Richardson, cuya composición se indica:

|                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| Azul de metileno ..... | 1 g                    |
| Azur II .....          | 1 g                    |
| Bórax .....            | 1 g                    |
| Glicerina (30%) .....  | 1 ml                   |
| Agua .....             | hasta completar 100 ml |

Las preparaciones teñidas fueron lavadas en agua, secadas de nuevo y montadas permanentemente en bálsamo de Canadá o en DePeX (solución neutra de poliestireno y plastificadores en xileno, comercializada por Serva).

Los cortes ultrafinos fueron depositados sobre rejillas de cobre (de 100 ó 200 celdas) recubiertas por una película de Formvar, y teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo (disoluciones acuosas saturadas). Las rejillas se han conservado durante tiempo indefinido (hasta la fecha) en un rejillero colocado dentro de un desecador.

### **3. Corte de las muestras en secciones de mayor grosor:**

#### **3.1. Cortes a congelación:**

Ha sido la técnica más utilizada, puesto que, al tiempo que permite una preservación buena de paredes celulares y contenidos lipídicos, proporciona un gran número de secciones en poco tiempo. Sin embargo, presenta la desventaja de suministrar cortes muy disgregados si el material es poco cohesionado (como es el caso de las cápsulas), así como de permitir sólo una grosera aproximación de la localización de la sección en el espécimen, considerando además la mezcla de secciones producida por el hecho de que de forma rutinaria se han cortado varias muestras de por vez, dado su pequeño tamaño y la dificultad práctica de orientarlas en la platina.

Se ha empleado generalmente material fresco o secado al aire, en ambos casos rehidratado tras 12 horas de inmersión en agua, y cortado en piezas inferiores a 5 mm en su dimensión máxima. Ocasionalmente se han utilizado también muestras fijadas en FPA o FAA, especialmente en el caso de las cápsulas, donde la dureza aportada por la fijación permitía compensar su escasa consistencia.

Las secciones se han realizado con un micrótopo de traslación Nakamura Works o uno de rotación Microm HM 340 E, ambos con cuchillas recambiables. Se ha elegido una temperatura de -35° C para conseguir una congelación rápida de la muestra que minimizara el daño en los tejidos por la formación de cristales de hielo. Aun así, el tiempo de congelación ha debido prolongarse a un mínimo de 20 minutos para asegurar que ésta afectaba a todo el material. Se ha estimado en 7° el ángulo de inclinación de la cuchilla con respecto a la vertical como el óptimo para la dureza y superficie de corte que ofrecían las muestras. Se ha escogido un grosor de las secciones variable entre 5 y 15 µm.



### **3.2) Cortes mediante inclusión en parafina:**

La técnica de inclusión en parafina y posterior corte contrarresta los inconvenientes antes mencionados. Su mayor interés es, precisamente, el proporcionar cortes seriados. Sin embargo, la modificación estructural es considerablemente mayor, puesto que precisa un protocolo que implica la exposición del material a disolventes que causan la pérdida de gran parte de los componentes lipídicos de los tejidos, la posible deformación de las células durante los procesos de deshidratación y desparafinado, y el empleo de temperaturas de 60° C durante el tiempo de inclusión. Por esta razón, este método siempre se ha aplicado sobre material fijado en FPA o FAA.

El protocolo empleado fue el siguiente:

#### **3.2.1. Deshidratación del material:**

|                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| . etanol de 30°   | 1 baño de 20 minutos  |
| . etanol de 50°   | 1 baño de 20 minutos  |
| . etanol de 70°   | 1 baño de 20 minutos  |
| . etanol de 96°   | 1 baño de 20 minutos  |
| . etanol absoluto | 2 baños de 20 minutos |

#### **3.2.2. Inclusión en parafina:**

|  |                       |
|--|-----------------------|
| . acetato de isoamilo                  | 2 baños de 30 minutos |
| . acetato de isoamilo : parafina (1:1) | 1 baño de 30 minutos  |
| . parafina                             | 1 baño de 30 minutos  |

Los dos últimos pasos se realizaron en estufa a 60° C. La parafina utilizada era de punto de fusión a 56° C.

### 3.2.3. Preparación del bloque y obtención de secciones:

Al terminar el tiempo de inclusión se vertió la parafina entre unas pinzas de Leuckart, orientando la muestra convenientemente, y tras solidificar por completo, se talló el bloque, se colocó en la plataforma del micrótomos y se reorientó para conseguir el plano de corte deseado. Se utilizó un micrótomos de rotación Minot Reichert-Jung. Las tiras de secciones, entre 8 y 10  $\mu\text{m}$  de grosor, se preestiraron en un baño de agua a 37° C, se recogieron sobre portas previamente impregnados en albúmina de Mayer<sup>5</sup>, para permitir su adherencia e impedir su pérdida durante el desparafinado y la tinción y, seguidamente, se dejaron estirar 30 minutos en la estufa a 60° C.

### 3.2.4. Desparafinado y rehidratación:

Los portas con las tiras de secciones fueron sumergidos en los siguientes líquidos:

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| . xileno .....          | 2 baños de 30 minutos       |
| . etanol absoluto ..... | 2 baños de 30 minutos       |
| . etanol de 96° .....   | 1 baño de 30 minutos        |
| . etanol de 70° .....   | 1 baño de 10 minutos        |
| . etanol de 50° .....   | 1 baño de 10 minutos        |
| . etanol de 30° .....   | 1 baño de 10 minutos        |
| . agua .....            | lavado durante 5-10 minutos |

---

<sup>5</sup> Este adhesivo se ha preparado formando una mezcla con la clara de un huevo y una cantidad igual de glicerina, filtrando la mezcla a través de celulosa y, finalmente, añadiendo un cristal de timol para evitar su contaminación (Johansen 1940).

### **3.3. Tinción y montaje:**

#### **3.3.1. Tinción:**

En este apartado se consideran solamente las tinciones con finalidad puramente morfológica, sin que de sus resultados se pretenda extraer ninguna conclusión sobre la composición de las estructuras teñidas. Las técnicas empleadas con esta finalidad se exponen en el epígrafe correspondiente a histoquímica.

No siempre se ha considerado necesario teñir los cortes, dado que la pigmentación natural de las paredes celulares normalmente es suficiente para observarlas al microscopio. No obstante, en ocasiones se ha precisado la tinción para incrementar el contraste en las secciones más delgadas, o para contribuir a diferenciar algunas estructuras. Siempre se han elegido colorantes hidrofílicos.

---

El proceso de tinción se ha realizado sumergiendo en el colorante los portas con las cortes adheridos (si procedían del micrótomos de parafina), o bien infiltrando el colorante y el agua de aclarado por capilaridad entre porta y cubre si las secciones, obtenidas con el micrótomos de congelación, estaban libres.

Se exponen a continuación las técnicas de coloración utilizadas:

1. verde de metilo<sup>6</sup> (0,01%) ..... 2 minutos  
. agua ..... lavado durante 2-3 minutos
2. azul de anilina<sup>6</sup> (1%) ..... 12-24 horas  
. agua ..... lavado durante 2-3 minutos
3. rojo Congo<sup>6</sup> (0,1%) ..... 1 hora  
. agua ..... lavado durante 2-3 minutos
4. azul de toluidina<sup>6</sup> (0,5%) ..... 15-30 minutos  
. agua acidulada (con una gota de HCl) ..... lavado durante 2-3 minutos

La única combinación empleada de estas técnicas ha sido la tinción con verde de metilo seguida de rojo Congo, por los buenos resultados que, en cuanto a la diferenciación de hidroides y placenta, había proporcionado en anteriores investigaciones (Estébanez 1991).

---

<sup>6</sup> En disolución acuosa

### 3.3.2. Montaje:

Se han empleado los siguientes medios de montaje, hidrofílicos y semipermanentes:

#### 1. Glicerogelatina, preparada según Johansen (1940):

|                   |      |
|-------------------|------|
| glicerina         | 50 g |
| gelatina en agua  |      |
| al 16,55%, dejada |      |
| disolver 2 horas  | 50 g |
| fenol             | 1 g  |

Tras mezclar durante 15 minutos, calentando con suavidad en agitación, y posteriormente filtrar, se han utilizado pequeños trozos de este medio, sólido a temperatura ambiente, y se han vuelto a fundir para montar las preparaciones, que pueden ser empleadas casi inmediatamente, por su rápida solidificación.

#### 2. Medio de Hoyer, preparado según Anderson (1954):

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| goma arábica en polvo | 30 g  |
| agua                  | 50 ml |
| hidrato de cloral     | 20 g  |
| glicerina             | 20 ml |

La mezcla se ha realizado en ese orden y a temperatura ambiente.

#### 3. Medio de Pearse (1961):

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| goma arábica en polvo | 1 g    |
| agua                  | 100 ml |
| sacarosa              | 30 g   |

La mezcla se ha realizado en ese orden calentando suavemente en agitación.

Los medios 2 y 3 no permiten la utilización inmediata de las preparaciones, sino tras solidificar transcurridas varias horas.

#### **4. Técnicas histoquímicas:**

Las reacciones se han llevado a cabo siempre sobre material no fijado y cortado a congelación en secciones de 15 µm, colocadas bien en pequeños viales, de donde, una vez aplicado el método histoquímico correspondiente, eran transferidas a portas para su observación, o bien directamente sobre éstos. Dado el carácter temporal de la mayoría de las preparaciones, no se montaron, desechándose tras su estudio.

De manera sistemática, antes de aplicar cada técnica sobre las muestras se han realizado los controles para comprobar el funcionamiento de los reactivos, así como que el resultado se debe a la reacción específicamente, y no a alguno de los reactivos o vehículos de los mismos por separado.

##### **4.1. Detección de sustancias ergásticas:**

###### *Almidón:*

Método del Lugol (Johansen 1940):

Preparación del reactivo:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| a) yoduro potásico | 2 g    |
| agua               | 100 ml |
| b) yodo            | 0,2 g  |

Tras mezclar a) y b), la solución resultante (Lugol) se conservó en oscuridad.

Realización:

|       |                             |
|-------|-----------------------------|
| Lugol | 2 minutos                   |
| agua  | lavado durante 2-3 minutos. |

El color azul-negro es indicativo de la presencia de almidón de cadena larga (amilosa), el pardo-rojizo, de almidón de cadena corta (amilopectina).

Control: se probó sobre pulpa de patata.

### *Lípidos:*

#### 1. Método del Sudán III o Sudán Black B:

Preparación del reactivo: disolución saturada de colorante en etanol acuoso (70°), filtrada justo antes de su uso.

Realización:

|                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| . etanol acuoso de 50° | 1 minuto              |
| . disolución de Sudán  | 15 minutos            |
| . etanol acuoso de 50° | lavado de 2-3 minutos |

Los lípidos se detectan al acumularse en ellos el colorante por solubilidad diferencial.

#### 2. Método del azul de Nilo, modificado de Gahan (1984):

Preparación del reactivo: disolución acuosa al 1% de azul de Nilo (sulfato A).

Realización:

|                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| . disolución de azul de Nilo | 30 segundos a 37° C            |
| . ácido acético acuoso (1%)  | lavado de 30 segundos a 37° C  |
| . ácido acético acuoso (1%)  | 2 horas a temperatura ambiente |
| . agua                       | lavado de 2-3 minutos          |

Los lípidos neutros se tiñen de rojo, y los ácidos, de azul. Se ha aumentado el tiempo de diferenciación en ácido acético a causa de la fuerte reacción de las paredes celulares con el componente azul del colorante.

Control: las técnicas de detección de lípidos se probaron sobre endosperma de almendra o nuez.

#### **4.2. Detección de componentes de pared:**

##### *Efecto de ácidos y álcalis:*

Se han añadido estos reactivos a las secciones para comprobar el efecto del pH sobre la coloración de las paredes celulares, lo que a la vez sirve de control para otras reacciones que emplean medios ácidos o básicos.

1. Ácido sulfúrico concentrado (Jensen 1962):

Además del posible cambio de color de las paredes, la resistencia de las mismas a este tratamiento se interpreta como posiblemente debida a la presencia de suberina.

2. Ácido clorhídrico concentrado.
3. Ácido perclórico (60%).
4. Hidróxido potásico acuoso (14%).
5. Hidróxido sódico 2 N.
6. Amoníaco concentrado.



*Detección de celulosa:*

1. Método del cloro-yoduro de zinc (Jensen 1962):

Preparación del reactivo:

|                 |                     |
|-----------------|---------------------|
| cloruro de zinc | 50 g                |
| yoduro potásico | 16 g                |
| agua            | 17 ml               |
| yodo            | hasta la saturación |

La disolución se dejó reposar varios días, y el sobrenadante se decantó, conservándose en oscuridad.

Realización: las secciones se montaron directamente en la disolución de cloro-yoduro de zinc.

La coloración azul se considera un resultado positivo.

---

2. Método del Lugol-ácido sulfúrico (Johansen 1940):

Realización:

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| . Lugol (ver página 47) | 2 minutos                            |
| . ácido sulfúrico (65%) | montaje de las secciones en el ácido |

La coloración azul se considera un resultado positivo.

Control: los reactivos para la detección de celulosa se probaron sobre pañuelos de papel.

*Detección de sustancias pécticas:*

1. Método del rojo de rutenio (Gahan 1984):

Preparación del reactivo:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| rojo de rutenio | 0,01 g |
| cloruro amónico | 0,1 g  |
| agua            | 100 ml |

El reactivo se ajusta con amoníaco a pH 9.

Realización:

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| . disolución de rojo de rutenio | 24 horas              |
| . agua                          | lavado de 2-3 minutos |

La coloración roja se considera indicativa de la presencia de sustancias pécticas.

2. Método de la hidroxilamina-cloruro férrico (Jensen 1962):

a) disolución alcalina de hidroxilamina<sup>7</sup>:

|  |       |
|--|-------|
| hidroxilamina (14%) en etanol acuoso de 60°    | 50 ml |
| hidróxido sódico (14%) en etanol acuoso de 60° | 50 ml |

b) disolución de ácido clorhídrico alcohólico:

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| ácido clorhídrico concentrado | 30 ml |
| etanol de 96°                 | 60 ml |

c) disolución de cloruro férrico alcohólico:

|   |       |
|---|-------|
| cloruro férrico                               | 5 g   |
| etanol de 60° en ácido clorhídrico 0,1 N (1%) | 45 ml |

---

<sup>7</sup> El reactivo debe de prepararse justo antes de su uso, dado que la disolución de hidroxilamina (14%) se desnaturaliza rápidamente.

**Realización:**

- . hidroxilamina alcalina ..... 1 parte, 5 minutos (tiempo mínimo)
- . ácido clorhídrico alcohólico ..... 1 parte  
(mezclar y retirar el exceso de disolución)
- . cloruro férrico alcohólico ..... unas gotas

La coloración rojo-granate se considera como un resultado positivo.

Control: ambas reacciones para detectar sustancias pécticas se han ensayado sobre albedo de naranja.

*Detección de lignina:*

Método del floroglucinol (Gahan 1984):

**Preparación del reactivo:**

|                 |       |
|-----------------|-------|
| floroglucina    | 10 g  |
| etanol absoluto | 95 ml |

**Realización:**

- . floroglucinol ..... 3-5 minutos
- . ácido clorhídrico concentrado ..... montaje de las secciones en el ácido

La coloración roja se interpreta como debida a la presencia de lignina.

Control: la reacción se probó sobre virutas de madera.

*Detección de sustancias fenólicas:*

Método del cloruro férrico (Gahan 1984):

Preparación del reactivo:

|                 |       |
|-----------------|-------|
| cloruro férrico | 2 g   |
| etanol de 96°   | 98 ml |

Realización: las secciones se montan directamente en el reactivo.

La coloración verde oscura es indicativa de la presencia de polifenoles.

Control: la reacción se ensayó sobre secciones de hojas de zarza.

## **5. Observación de las muestras:**

### **5.1. Microscopía óptica:**

Las observaciones de cortes semifinos y de mayor grosor se realizaron utilizando un microscopio Olympus BH-2, al que se le acoplaron dos prismas de Nicol para tener la posibilidad de analizar el comportamiento de las muestras con luz polarizada. Una cámara Olympus permitió dejar constancia gráfica de las imágenes observadas.

### **5.2. Microscopía electrónica de barrido:**

Las muestras, secadas a punto crítico y metalizadas, se observaron en un microscopio JEOL-JSM-T-330 A, instalado en el Real Jardín Botánico de Madrid.

### **5.3. Microscopía electrónica de transmisión:**

Las rejillas, una vez teñidas y secas, se observaron en un microscopio Zeiss 902, del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid; o bien en un JEOL-JEM-1010, instalado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de dicha Universidad.

## Fitoquímica

Se realizó una prueba preliminar sobre las diez especies, para localizar los compuestos más abundantes comunes a todas ellas.

Del material de cada una, conservado en congelación, se separaron y limpiaron, uno por uno, los especímenes correspondientes (incluyendo, en su caso, el esporófito), para asegurar la ausencia de ejemplares de otras especies, así como de restos vegetales, puestas de huevos, etc. Otras impurezas de menor tamaño (tierra, polen, etc.) fueron eliminadas mediante prolongados lavados en agua corriente. Posteriormente el material se dejó secar a la sombra, y se almacenó, por periodos inferiores a un mes, hasta su extracción. De cada especie se consiguió reunir una cantidad final de muestra de 5 g en peso seco.

La extracción se realizó en Soxhlet, sobre material previamente triturado, utilizando como disolventes, sucesivamente, n-hexano y etanol, durante 48 horas cada uno. Los extractos se evaporaron en rotavapor a sequedad, se redisolviéron en cloroformo y se percolaron en alúmina neutra. Se reevaporaron y se aplicaron en una capa fina de gel de sílice. El cromatograma se desarrolló utilizando n-hexano:acetato de etilo (80:20) como fase móvil. El revelado se realizó o bien con vapores de amoníaco, si se trataba de detectar la presencia de flavonoides, o bien pulverizándolo con *oleum*: ácido sulfúrico:ácido acético:agua (5:1:20), y dejándolo unos minutos en estufa a 110° C. En ambos casos se observó con luz visible y con luz ultravioleta.

Una vez localizados los compuestos abundantes en todas las especies, la investigación se centró en una sola, *Gr. pulvinata*, elegida por su fácil recolección e identificación. Se empleó una mayor cantidad de material, sobre el que se aplicaron técnicas destinadas a la extracción, aislamiento e identificación de los compuestos seleccionados.

En este caso, dado que los compuestos objeto de estudio estaban ya seleccionados y se conocía de ellos su comportamiento cromatográfico, la presencia de un pequeño grado de contaminación no parecía susceptible de afectar su posterior análisis. Por ello, y puesto que éste requería de mayores cantidades de material, la limpieza se realizó menos exhaustivamente (se utilizaron pulvínulos no colonizados por otras especies, pero no se retiraron las partículas de pequeño tamaño extrañas al musgo). Tras conseguirse 100 g de muestra, se trituro y se colocó en un Soxhlet para su extracción en etanol durante 3 días, sin utilizarse previamente el n-hexano, dado que en la prueba preliminar no se halló ningún compuesto procedente de los extractos en este disolvente que fuera adicional a los separados de los etanólicos.

Tras concentrar el extracto en rotavapor, los compuestos se aislaron, en primer lugar, mediante varios fraccionamientos en columna de gel de sílice (eluyendo con n-hexano y acetato de etilo 80:20), y de Sephadex LH-20 (eluyendo con metanol, cloroformo y n-hexano 1:1:2). La presencia de la sustancia buscada en las sucesivas fracciones se aseguró mediante cromatografía en capa fina (empleando como fase móvil la proporción de n-hexano:acetato de etilo que mejor separación diera, y revelando el cromatograma como se ha expuesto anteriormente). En segundo lugar, se realizaron cromatografías en capas gruesas de las fracciones (con n-hexano y acetato de etilo 90:10 ó 80:20 como fase móvil) para separar y eluir los compuestos buscados.

La identificación se realizó utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$ -RMN), espectrometría de masas (EM), espectroscopía infrarroja (IR) y co-cromatografía en capa fina con sustancias patrón.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## ANATOMÍA: RESULTADOS

### Gametó fito

#### CAULIDIO

La descripción básica se ha realizado sobre la región de mayor complejidad estructural dentro de cada especie. Ésta corresponde a la zona más apical de los caulidios, una vez diferenciados todos sus tejidos. En las que fructifican, se han elegido ejemplares fértiles. Posteriormente se han especificado las modificaciones que pueden aparecer en otras regiones del caulidio.

Aunque la naturaleza de estos tejidos será objeto de discusión, por el momento se emplea la terminología más comúnmente aceptada, recogida por Hébant (1977).

En sección transversal, las células aparecen siempre en disposición alterna. Las paredes presentan dos estratos. El primario es bastante opaco a los electrones y en ocasiones es difícil diferenciar su estructura, forma los triángulos (raramente tetraedros) en las confluencias de las células y en los tabiques se distribuye a ambos lados de la lámina media. El estrato secundario muestra un aspecto fibrilar, ocasionalmente subestratificado. Los grosores que se indican corresponden, en el caso de la pared primaria y de los tabiques de los hidroides al total presentado por dos células vecinas, mientras que para la pared secundaria se refiere sólo al de una célula.

Los caulidios están rodeados por una cutícula transparente a los electrones, y presentan tres tejidos fundamentales, con paredes de grosor decreciente desde la periferia hasta el centro. Se señala que hay especies en que alguno de estos tejidos puede no estar diferenciado.

. Epidermis. Se trata de un complejo formado por las bases de filidios en diferenciación y por la epidermis real del caulidio. Según la densidad de las bases de los filidios imbricados y de su disposición, forma un cilindro exterior de grosor y contorno desigual, no siempre claramente delimitable. En general, sus células son de contorno irregularmente poligonal, con tendencia a alargarse tangencialmente, de tamaño relativamente pequeño y de paredes gruesas.

. Parénquima. Está constituido por un número variable de estratos de células, generalmente isodiamétricas en sección transversal, de forma irregularmente poligonal.

. Hidroma. Forma la traza conductora, no siempre presente, en el centro del caulidio. Consta de células siempre muertas, en número variable, con estratos primario y secundario de la pared altamente degradados. Frecuentemente presentan un contorno variable en sección transversal. En corte longitudinal sus paredes transversales son oblicuas, aunque por la dificultad de obtención de cortes sagitales y la fácil ruptura de sus paredes celulares se han omitido las medidas correspondientes a esta dimensión.

No aparecen espacios intercelulares en la epidermis y el parénquima. Las células presentan entre sí gran abundancia de comunicaciones plasmodesmáticas, especialmente en las paredes transversales. Pueden aparecer aisladamente, pero son frecuentes los campos de punteaduras primarias, especialmente en las regiones apicales del caulidio. Sólo se han considerado como campos de punteaduras los que cumplen las siguientes condiciones:

. Suponen una constricción, más o menos brusca, de la pared secundaria, aunque ésta participa, al menos en pequeña proporción, en la constitución de esta estructura.

. Causan una pérdida de la organización típica de la pared, sin que se diferencien claramente los estratos ni la organización de éstos. Es frecuente que aumente su densidad electrónica.

Las zonas perforadas de las paredes, más o menos delgadas, aunque no constreñidas, con plasmodesmos atravesando su espesor, pero con su estructura intacta, ocasionalmente presentes, no se han considerado como campo de punteaduras primarias.

En cuanto a las reacciones histoquímicas<sup>1</sup>, se exponen los resultados comunes a los caulidios de todas las especies:

. No se ha detectado en ningún caso almidón, aunque algunas regiones parecen oscurecerse levemente.

. La aplicación de los colorantes tipo Sudán ha demostrado la presencia de abundantes lípidos en el citoplasma celular.

. La reacción para la detección de celulosa, descrita como inmediata por Jensen (1962), ha necesitado al menos veinticuatro horas para tener lugar, dando resultados variables. En general, la pared primaria no reacciona (aunque sólo se distingue en la epidermis). Los resultados descritos se refieren sólo al estrato secundario.

. En todas las especies ha sido fallida la detección de ligninas y suberinas, aunque se señala que las yemas de multiplicación vegetativa de *Gr. hartmanii*, *Gr. torquata* y *Gr. trichophylla* mantienen su estructura tras veinticuatro horas en ácido sulfúrico concentrado, disolviéndose sólo en tiempos más prolongados.

. Las disoluciones básicas producen un enrojecimiento de las paredes celulares (fig. 10 B), con distinta intensidad en los diversos tejidos.

. En medios ácidos no se han apreciado cambios de coloración.

---

<sup>1</sup> las pruebas histoquímicas realizadas sobre la pared en esta tesis, por observarse con microscopía óptica, no permiten resolver con precisión las diferencias entre los estratos primario y secundario. Por ello, las que en algunos casos se indican son sólo aproximadas. Por otra parte, donde la pared es delgada, cobran importancia las interferencias producidas por la difracción, dificultándose la interpretación de los resultados. Por este motivo, no se presentan aquí observaciones histoquímicas relativas a los hidroides.

## FILIDIO

La descripción se ha realizado sobre secciones transversales del filidio a tres niveles: basal, medio y apical. En cada una de ellas se ha analizado separadamente el nervio y el limbo. Los números de células indicados corresponden, en el caso del nervio, a todo él, y en el del limbo sólo a la mitad.

El filidio, inicialmente unido a la epidermis del caulidio en toda su extensión, libera primero sus márgenes en su diferenciación, y en último lugar el nervio. Una excepción se produce en *Gr. torquata*, donde este proceso se realiza a la inversa, desarrollándose una cámara entre el filidio y el caulidio en donde frecuentemente se observan pelos mucilaginosos y abundante epiflora.

En el filidio aparecen los siguientes tipos celulares:

- . Células parenquimáticas: constituyen con exclusividad el limbo, asimismo pueden estar o no en el nervio.

- . Estereidas: son células de paredes muy engrosadas, de localización variable en el nervio.

- . Células leptodermas: su posición en el nervio es central, y presentan un aspecto semejante a los hidroides del caulidio. No se observan en todas las especies.

- . Células-guía: aparecen en el nervio en posición adaxial, y se diferencian por poseer engrosada la pared correspondiente a esta cara, y por su mayor lumen.

En todos los casos, los filidios están rodeados por una cutícula, y las células presentan una pared primaria considerablemente engrosada, en especial la que constituye la superficie periférica, donde puede alcanzar un espesor de 1-2  $\mu\text{m}$ ; y una pared secundaria variable según los tipos celulares.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, los filidios presentan los siguientes comportamientos comunes:

. El almidón se detecta, bajo una apariencia informe, en su mitad apical, correspondiente a la localización preferente de cloroplastos. Una excepción la constituye *Gr. torquata*, donde se ha observado en toda la extensión del filidio.

. Aunque la aplicación de Sudán III y Sudán Black demuestra la presencia de lípidos, éstos no suelen encontrarse en forma de grandes acúmulos. Es frecuente su detección asociada a los cloroplastos, que sugiere su localización intraplastidial.

. La detección de celulosa en la pared tarda varias horas en producirse, y da un doble resultado: positivo para la pared secundaria, y negativo para la pared primaria. Aplicando de ácido sulfúrico tras el Lugol, se observa la formación de agujas de cristales sobre la superficie del filidio.

. La reacción para las sustancias pécticas se produce con fuerte intensidad, excepto en los filidios de *Gr. funalis*.

. Los filidios demuestran ser las estructuras con mayor abundancia de sustancias fenólicas, especialmente acumuladas en las paredes de sus elementos celulares reforzados (fig. 8 B).

. Las disoluciones básicas causan un viraje de la coloración de la pared a amarillo vivo, excepto en las bases, donde la reacción es como se ha indicado para los caulidios.

. Las disoluciones ácidas producen una decoloración, o bien una tonalidad amarillenta, en las paredes de los filidios.

Se ha realizado un estudio de la punta pilífera que remata el ápice del filidio. En corte transversal, el pelo está constituido por células muertas, de paredes muy reforzadas, que dan resultado positivo tan sólo para la detección de la celulosa (que se produce de manera inmediata y con fuerte intensidad).

Con microscopía electrónica de barrido, el pelo se observa como una estructura tridimensional, formada por fibras (que corresponden a las anteriores células) densamente empaquetadas, no torsionadas. El nervio del filidio no participa en su constitución, y termina en todos los casos en su base.

El comportamiento ante la luz polarizada indica la presencia de refuerzos de ordenación cristalina o paracristalina (probablemente celulósicos) en el nervio, el margen y la punta pilífera. Sin embargo, se observa con más intensidad en el pelo y en regiones concretas del nervio que se especifican en cada caso.

*Gr. decipiens*

CAULIDIO

Diámetro de 220-250  $\mu\text{m}$ .

La epidermis consta de 1-3 estratos, irregulares según la diferenciación de filidios (es uniestrata donde no los hay). Las células son de 15-18  $\mu\text{m}$  en su dimensión tangencial, 8-15  $\mu\text{m}$  en la radial y 70-100  $\mu\text{m}$  en la longitudinal.

El parénquima presenta 4-6 estratos de células de 100-150  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, más o menos isodiamétricas en corte transversal, con 15-25  $\mu\text{m}$  de diámetro, con los máximos valores, por lo general, en las células más internas (fig. 1 A).

El hidroma está constituido por 25-35 células de 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro en sección transversal, que dan una traza de contorno muy irregular (fig. 1 A).

La epidermis y el parénquima presentan una pared primaria muy electrondensa, con un estrato interno sin estructura distinguishable, que forma los trígonos, y una banda más transparente, fibrilar, sólo perceptible en la epidermis y el parénquima. La pared primaria tiene un grosor total de 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  en los tabiques epidérmicos, y queda constreñida a una fina línea en el parénquima interno. No forma un engrosamiento apreciable en la periferia del caulidio, salvo si se trata de un filidio en diferenciación (fig. 2 B).

La pared secundaria es uniestrata, medianamente opaca a los electrones, muy densamente fibrilar, subdividida en bandas por finas líneas concéntricas muy electrondensas. Ocasionalmente está bordeada internamente por una estrecha banda opaca. Su grosor disminuye gradualmente desde la epidermis (2-2,5  $\mu\text{m}$ ) hacia el interior (0,5  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno). Este espesor es bastante regular para una misma célula, y si existen irregularidades no están polarizadas.

Se observan algunos plasmodesmos aislados, frecuentemente en la epidermis. Pero son más frecuentes los agrupados en campos de punteaduras primarias, más abundantes en el parénquima (fig. 2 A), pero también presentes en la epidermis. Suelen distribuirse preferentemente en las paredes transversales, pero se encuentran también en las longitudinales. Los campos de punteaduras primarias producen un adelgazamiento gradual de la pared contigua, y su espesor total es de 0,6  $\mu\text{m}$ .

La delimitación entre el parénquima y la epidermis es relativamente clara, por el alargamiento tangencial y el menor tamaño celular en ésta.

Las paredes de los hidroides presentan trígonos muy opacos a los electrones, donde ocasionalmente se percibe una banda fibrilar semejante a la aparecida en los otros tejidos. No se ven bordeados por pared secundaria. Los lados de la pared muestran una estructura fibrilar laxa, poco densa a los electrones, donde no se diferencian estratos primario o secundario, con un grosor total de 0,4  $\mu\text{m}$ .

La transición entre parénquima e hidroma es siempre brusca, y en la superficie de contacto, la pared parenquimática mantiene siempre su estructura, mientras que la del hidroide se observa degradada, aunque conserva en este caso su pared primaria en los tabiques.



Se observa una alta degradación citoplasmática, con abundantes restos vacuolizados, cloroplastos en degradación, etc., a menudo encerrados en guirnaldas de retículo endoplasmático. Los lípidos se acumulan en grandes cantidades (fig. 2A), llegando a ocupar casi la totalidad del lumen celular en la epidermis.

Aparecen túneles de degradación de la pared, desarrollados desde el exterior, probablemente producidos por microorganismos, aunque éstos no se han visto en este nivel.

Hacia la parte basal se pierde casi completamente la actividad celular y disminuye la acumulación de lípidos. El diámetro del caulidio se mantiene hasta niveles muy basales, en que se reduce a 150-200  $\mu\text{m}$ . Se conserva la cutícula, y la epidermis no presenta un apreciable engrosamiento de sus paredes celulares. Degenera la traza de hidroides, en algunas regiones aparece una laguna central, y cuando se observan, los tabiques están desestructurados, y los trígonos se degradan en su periferia. Aparecen abundantes microorganismos de organización procariota, tanto en el lumen como en las paredes de las células periféricas. No se ha encontrado una vaina de tejido degradado circundando el caulidio.

El caulidio, cuyo color natural es pardo-amarillento, más oscuro en la base, enrojece en presencia de soluciones básicas, fuertemente en regiones basales y menos intensamente en el ápice.

La reacción para la detección de celulosa se produce con bastante intensidad en todas las paredes, así como la correspondiente a la localización de sustancias pécticas. Se demuestra acumulación de sustancias fenólicas en la epidermis. Las secciones mantienen su integridad durante unas horas en ácido sulfúrico concentrado.

La coloración con azul de Nilo muestra una predominancia de lípidos neutros, aunque en las yemas de ramificación se encuentran mezclas de neutros y ácidos.

#### FILIDIO

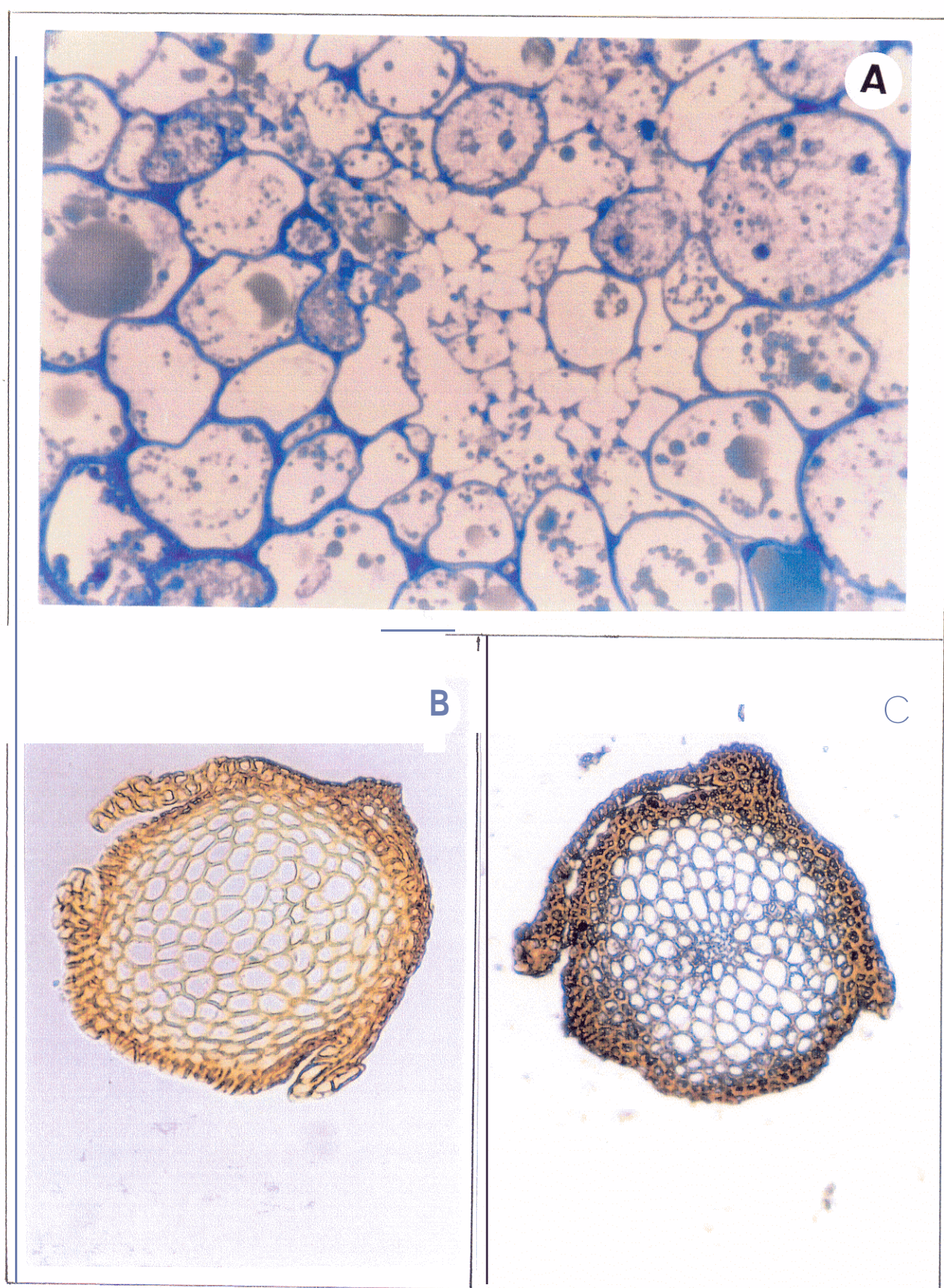
. Nivel basal: el nervio presenta cuatro células-guía adaxiales, semejantes entre sí, y uno o dos estratos, cada uno con 10-12 estereidas de contorno simétrico en sección transversal, en su envés. El nervio presenta un contorno en media luna, poco resaltado en la superficie abaxial del filidio. El limbo comprende en cada lado 30 células, alargadas en sentido lateral, ligeramente convexas hacia ambas superficies externas. El margen es muy recurvado en ambos lados (frecuentemente más en uno de ellos), uniestrato.

---

**Fig. 1.** A: Corte transversal de caulidio apical de *Gr. decipiens*, teñido con azul de metileno, 850×. B: Corte transversal de caulidio apical estéril de *Gr. elatior*, sin teñir, 220×. C: Corte transversal caulidio apical fértil de *Gr. elatior*, sin teñir, 220×.

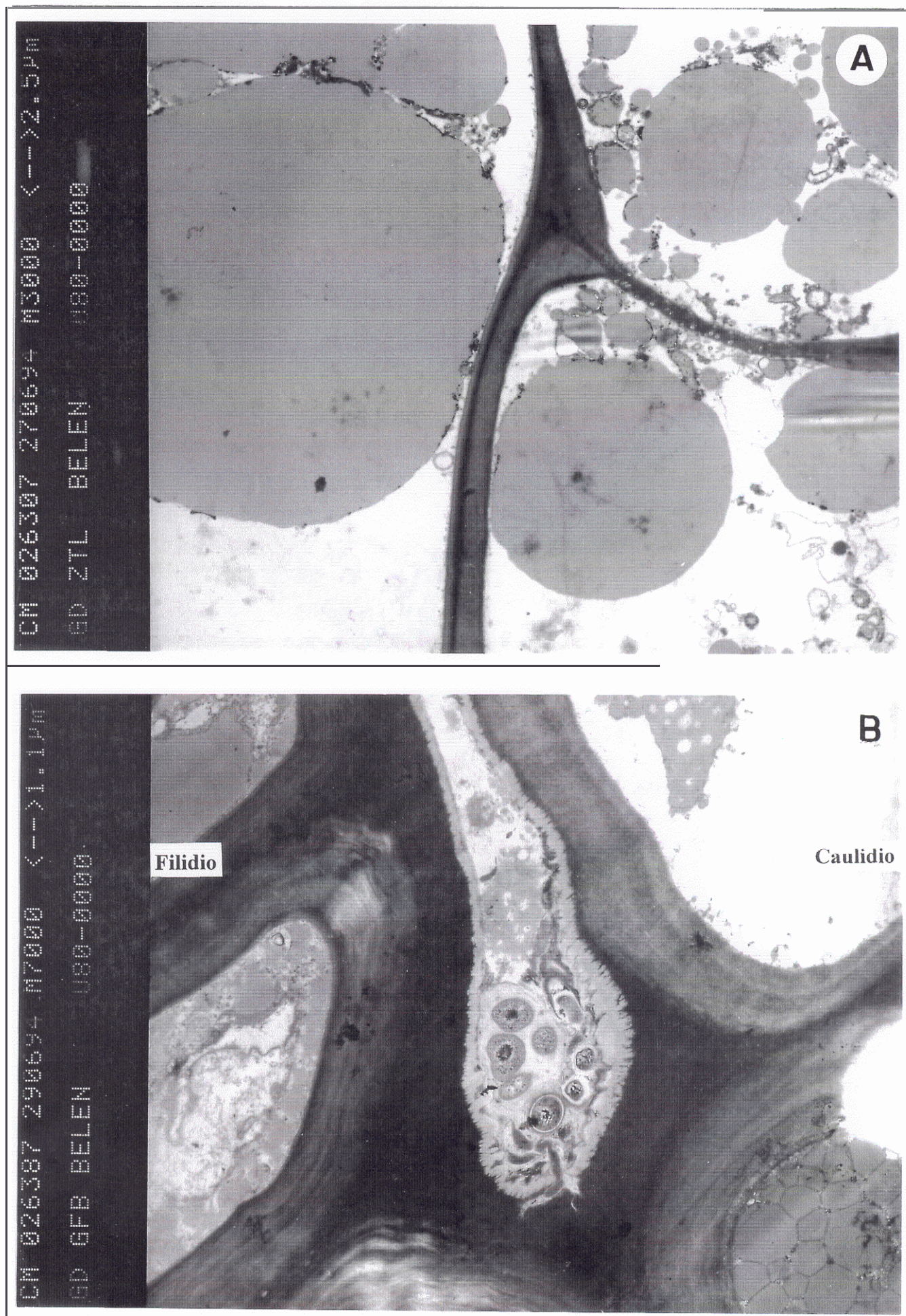
**Fig. 2.** A: Corte longitudinal de parénquima apical, con campos de punteaduras primarias, de *Gr. decipiens* a MET. B: Corte transversal de caulidio de *Gr. decipiens*, detalle de la inserción de un filidio a MET.

---













. Nivel medio: el nervio muestra cuatro células-guía, de las que las dos centrales son mayores. En su envés presenta una capa de 10-12 células parenquimáticas ligeramente menores que las del limbo. En su interior se encuentra una capa irregular de 6-10 estereidas. El contorno del nervio es laxamente trilobulado, y resalta acusadamente en la superficie abaxial del filidio. El limbo tiene una anchura de 25-30 células, más o menos cuadradas, con lumen ovalado, alargado en sentido anteroposterior, en sección transversal. Ocasionalmente es irregularmente biestratificado. El margen es menos recurvado, uniestrato, ocasionalmente crenulado por la convexidad de las paredes celulares abaxiales y adaxiales.

. Nivel apical: el nervio tiende a redondear su contorno, aunque a veces las células periféricas constituyen protuberancias irregulares. Las células tienden a la uniformidad, acercándose al tipo parenquimático del limbo. Esta región presenta mayor tendencia a la biestratificación, y las 2-3 filas marginales pueden ser triestratas.

La punta pilífera es decurrente hacia el margen, dentada especialmente en esta zona, y en corte transversal se observa compuesta por 30 fibras en su región basal.

La máxima intensidad ante la luz polarizada la presenta la base del filidio, el primer tercio del nervio y el pelo.

***Gr. elatior***

*CAULIDIO*

Diámetro de 150-200  $\mu\text{m}$ .

Existe una clara diferenciación entre caulidios fértiles y estériles: los primeros poseen hidroma desde el ápice hasta la parte media, los últimos carecen de ella (figs. 1 B, C).

La epidermis está formada por 2-4 estratos, con un contorno más o menos regular. Las células son más o menos isodiamétricas en corte transversal, con un diámetro de 8-12  $\mu\text{m}$ , que tienden levemente a alargarse tangencialmente, y de 20-30  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal (figs. 1 B, C).

El parénquima consta de 4-6 estratos de células isodiamétricas en sección transversal, de 15-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, y 20-30  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, más o menos semejantes entre sí (figs. 1 B, C).

El hidroma es de contorno más o menos regular, formado por 50 ó más células de 10-15  $\mu\text{m}$  de diámetro (fig. 1 C).

En el interior de caulidios estériles las células son claramente parenquimáticas, sin que se observe ningún estado de transición hacia el hidroma.



La epidermis y el parénquima presentan una pared celular primaria electrondensa, biestrata, con un estrato interno más o menos homogéneo, formador de triángulos, y una franja, sólo visible en epidermis, fibrilar. El grosor de la pared primaria alcanza 0,6  $\mu\text{m}$  en la epidermis, hacia el interior se reduce a una línea. No se engruesa significativamente en la periferia, salvo si corresponde a la diferenciación de un filidio.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, medianamente opaca a los electrones. En ocasiones está bordeada por una línea interna o aparece un estrato interno de estructura reticular, más opaco. En la epidermis alcanza 1,5  $\mu\text{m}$  de grosor, que se adelgaza gradualmente hasta 0,5  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno. El espesor es algo irregular en cada célula, pero no de forma polarizada.

Las células se comunican por algunos plasmodesmos aislados, pero en su mayor parte se agrupan en campos de punteaduras, observados con gran abundancia tanto en corte transversal como longitudinal, de variables dimensiones, preferentemente distribuidos en el parénquima. Producen un adelgazamiento muy brusco de la pared secundaria, para alcanzar un grosor final de 0,5  $\mu\text{m}$ .

La transición entre la epidermis y el parénquima es más o menos clara, especialmente por las diferencias de tamaño.

Las paredes de los hidroides presentan triángulos degradados en su periferia, bordeados por una estrecha banda de pared secundaria laxamente fibrilar. Los lados presentan un grosor de 0,6-0,8  $\mu\text{m}$ , de estructura fibrilar desorganizada, donde se distingue la lámina media.

En el contacto con el parénquima, tan sólo la pared de los hidroides presenta degradación y ésta no afecta a la pared primaria.

La actividad citoplasmática es muy escasa, sólo se han observado restos degradados y acúmulos lipídicos, fundamentalmente en las células epidérmicas. Se ha constatado la presencia de abundantes microorganismos procariontes en la periferia del caulidio.

En regiones más basales del caulidio disminuye progresivamente el número de células del hidroma hasta desaparecer por completo. La pared secundaria se engruesa (2,5  $\mu\text{m}$  en la epidermis, 0,7  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno). No se observa degradación de la cutícula. La invasión de microorganismos alcanza frecuentemente el interior del caulidio. Éste está circundado por una estrecha vaina de tejido degenerado, con abundantes microorganismos, que en estado hidratado posee una textura gelatinosa.

En cuanto a las reacciones histoquímicas de pared, partiendo de una coloración natural amarillo-naranja en el ápice y rojiza en la zona basal, en medios alcalinos se produce un viraje a rojo intenso. La reacción para la celulosa, así como para las sustancias pécticas se presenta con intensidad débil. Tan sólo los filidios en diferenciación muestran abundancia de sustancias fenólicas. El azul de Nilo muestra la presencia de acúmulos lipídicos ácidos o bien neutros, sin mezcla.

#### *FILIDIO*

. Nivel basal: el nervio presenta 2 (3) células-guía adaxiales, y un segundo estrato de cuatro células similares. En el envés aparecen dos o tres estratos, cada uno con cerca de 15 estereidas, con lumen casi colapsado. El limbo tiene una anchura de 30 células, alargadas en sentido lateral, con las paredes externas convexas. El margen es fuertemente recurvado a un lado (2 ó 3 espiras), y algo menos al otro. En este nivel se presentan ocasionales biestratificaciones irregulares, y las células a veces son papilosas.

. Nivel medio: El nervio posee un primer estrato de dos células-guía adaxiales, y un segundo de 4-6. En el envés aparecen dos o tres estratos de 15 estereidas cada uno, con el lumen algo mayor. El contorno del nervio es redondeado y resalta fuertemente en la superficie abaxial del filidio. El limbo tiene una anchura de 40 células o más, con alta tendencia a biestratificarse irregularmente. Se observan abundantes papilas en ambas superficies. El margen es variablemente recurvado (frecuentemente un lado más que otro) y es biestratificado en sus dos últimas filas.

. Nivel apical: todas las células del filidio son uniformes, parenquimáticas, muy marcadamente papilosas, e irregularmente distribuidas en dos o tres estratos.

La punta pilífera es algo decurrente hacia el margen, denticulada por encima de este nivel, y en corte transversal presenta un máximo de cerca de 30 células.

La máxima actividad ante la luz polarizada se detecta en la mitad basal del nervio y en el pelo.

**Gr. funalis**

CAULIDIO

Diámetro de 120-150  $\mu\text{m}$ .

La epidermis es uniestrata (a veces biestrata), con células de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, con diámetro de 5-8  $\mu\text{m}$ , en sección transversal (fig. 3 C).

El parénquima consta de 2-3 estratos de células de 30-40  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, isodiamétricas, y con diámetro de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  en sección transversal, bastante regulares (fig. 3 C).

El hidroma es de contorno regular, formado por células de 5-6  $\mu\text{m}$  en sección transversal, en número normalmente superior a 20 en caulidios fértiles, y de 8-15 en estériles.

Las células parenquimáticas y epidérmicas poseen una pared primaria muy densa a los electrones. En las células periféricas se distingue una banda externa algo difusa. El grosor total de la pared primaria es de 0,5-1  $\mu\text{m}$  en la periferia, y se constriñe a una fina línea hacia el interior. No se engruesa en la superficie externa del caulidio, a menos que se trate de un filidio en diferenciación.

La pared secundaria es medianamente opaca, biestrata, con un estrato fibrilar denso, en el que a veces se distinguen bandas, bordeado internamente por un estrato laxo, más opaco, de estructura reticular o fibrilar. En la epidermis alcanza un grosor de 0,5-1  $\mu\text{m}$ , y es uniforme para una misma célula, excepto si presenta campos de punteaduras.

Los plasmodesmos se han observado sólo agrupados en campos de punteaduras, con preferencia en las paredes transversales, aunque que son relativamente poco abundantes. Producen un adelgazamiento paulatino, y poco marcado, de la pared contigua, hasta alcanzar un espesor de 0,5  $\mu\text{m}$ .

La transición entre epidermis y parénquima es bastante gradual, de forma que la epidermis no es un tejido bien diferenciado en esta especie (figs. 3 B, C).

La pared de los hidroides presenta trigonos degradados en su periferia. En su interior se diferencian a menudo campos con abundantes perforaciones (fig. 3 A). Los lados presentan una estructura laxamente fibrilar, escasa densidad electrónica y un grosor de 0,3  $\mu\text{m}$ . En ellos no se puede distinguir los estratos que componen la pared.

En la zona de contacto entre parénquima e hidroma permanece íntegra la pared parenquimática, así como el estrato primario de la de los hidroides.

El citoplasma aparece degradado, con restos de mitocondrias, alto grado de vacuolización, y abundantes acúmulos de lípidos en todas las células, salvo en los hidroides.

No se han observado microorganismos invadiendo los tejidos, ni señales de su presencia.

Hacia la base del caulidio, se mantiene la cutícula, decrece el diámetro de la sección hasta 70  $\mu\text{m}$ , se desestructuran las paredes de los hidroides hasta acabar por desaparecer la traza central, y se elimina la distinción entre epidermis y parénquima, con lo que se alcanza una uniformidad celular en la sección, que puede quedar reducida a 10 células. Aparecen perforaciones en las paredes, algo desorganizadas. La pared secundaria se engruesa hasta 2-2,5  $\mu\text{m}$ . No parece decrecer la actividad celular ni la acumulación de lípidos.

Se observa una vaina, de hasta 10  $\mu\text{m}$  de espesor, de tejido degenerado con abundantes microorganismos, circundando el caulidio, aunque éstos no han aparecido en su interior (fig. 3 B).

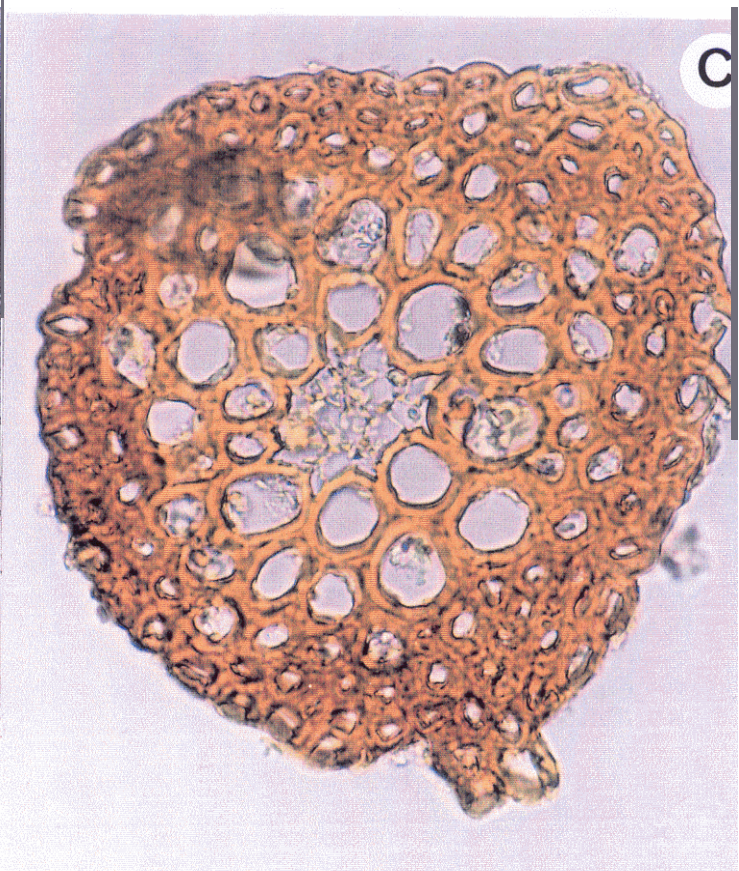
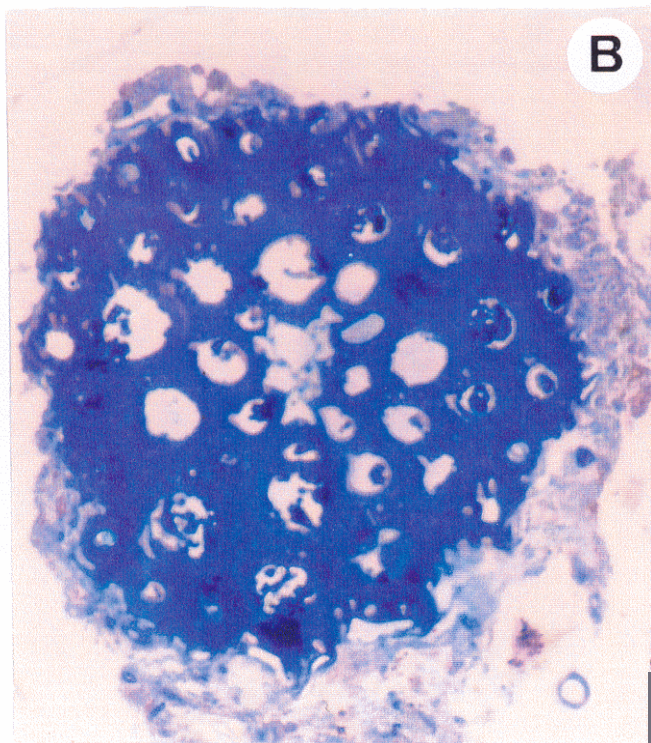
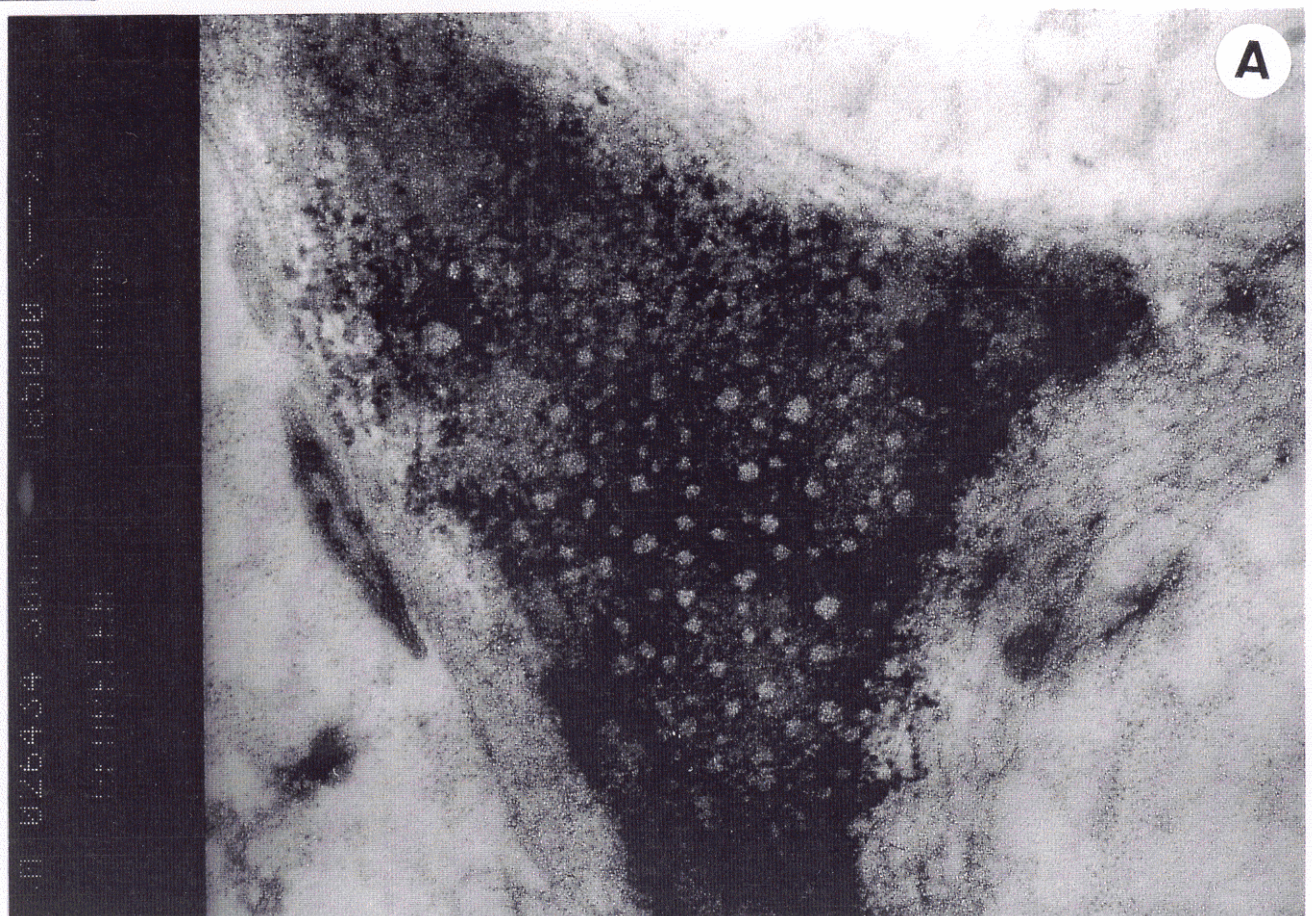
La pared, cuyo color natural es anaranjando en el ápice y rojizo hacia la base, da un fuerte enrojecimiento en medios alcalinos (fig. 3 C), se mantiene unas horas en ácido sulfúrico concentrado antes de desorganizarse, y da una reacción intensa para la detección de pectinas. Tan sólo la periferia muestra acumulación de fenoles. La prueba para la detección de celulosa ofrece un resultado dudoso, al producir un fuerte oscurecimiento, con una coloración que no se corresponde con la descrita. En los acúmulos de lípidos predominan los ácidos.

---

**Fig. 3.** A: Corte transversal de trígono de la traza de hidroides de *Gr. funalis*, mostrando las áreas de perforaciones, a MET. B: Corte transversal de caulidio basal de *Gr. funalis*, teñido con azul de metileno, 740 $\times$ . C: Corte transversal de caulidio de *Gr. funalis*, reacción con potasa, 600 $\times$ .

---











*FILIDIO*

. Nivel basal: el nervio tiene dos células-guía adaxiales, un estrato de 6 estereidas abaxiales y una capa interna de estereidas casi colapsadas. Su contorno, semilunar, resalta poco en el envés. El limbo tiene 20 células de anchura, que son de paredes convexas en ambas caras y alargadas en sentido lateral. Ocasionalmente es biestratificado en algunos puntos. El margen es plano, uniestrato.

. Nivel medio: el nervio presenta dos células adaxiales, una capa de aproximadamente seis estereidas abaxiales, que a veces forman protuberancias irregulares, y una capa interna de 3 ó 4 células de paredes muy adelgazadas. El contorno del nervio es redondeado, con escaso resalte en el envés. El limbo presenta hasta 40 células de anchura, es irregularmente biestrato, y su margen es plano o ligeramente recurvado, con una o dos células de grosor.

. Nivel apical: las células se igualan todas al tipo parenquimático del limbo, con la excepción ocasional de las células centrales del nervio. El filidio se hace irregularmente bi- o triestrato.

La punta pilífera es decurrente, denticulada, y con un máximo de 15-20 células en corte transversal.

Ante la luz polarizada, la máxima actividad la muestra la base, la mitad basal del nervio y el pelo.

***Gr. hartmanii***

*CAULIDIO*

Diámetro de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ .

La epidermis es muy diferenciada, de contorno aproximadamente regular, con 2-3 estratos de células de 50  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, más o menos isodiamétricas o levemente alargadas tangencialmente en sección transversal, con diámetro de 10-15  $\mu\text{m}$  (figs. 4 A, B).

El parénquima consta de 4 ó 5 estratos de células de 50-70  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, aproximadamente isodiamétricas en su sección transversal, con diámetro de 15-20  $\mu\text{m}$ , con los mínimos valores en las internas y los máximos en las centrales. Las periféricas pueden tender a alargarse tangencialmente (figs. 4 A, B).

No se ha observado en ningún caso la presencia de una traza de hidroides, y las células centrales muestran características claramente parenquimáticas, sin ninguna tendencia a la degradación de la pared (fig. 4 A).

Estos tejidos presentan una pared primaria biestrata, con un estrato interno denso, con apariencia homogénea, que forma los trígonos, y una banda interna fibrilar, perceptible en todas las células. La pared primaria alcanza un grosor de 0,8  $\mu\text{m}$  en la epidermis, que disminuye a 0,2  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno. No forma una banda periférica engrosada, salvo en los filidios en diferenciación.

La pared secundaria es uniestrata, muy densamente fibrilar, con un grosor de 1-1,5  $\mu\text{m}$  en la epidermis, que decrece gradualmente hasta 0,3  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno. Su espesor es muy regular para cada célula.

Se observan algunos plasmodesmos aislados entre las células parenquimáticas, pero son más frecuentes los campos de punteaduras primarias, principalmente distribuidos en las paredes transversales. Su presencia supone un adelgazamiento gradual de la pared hasta alcanzar un grosor final de 0,6  $\mu\text{m}$ .

La delimitación entre epidermis y parénquima es siempre clara (figs. 4 A, B).

No se han encontrado orgánulos citoplasmáticos, sólo restos degenerados de membranas y acúmulos lipídicos.

Hacia la base, el diámetro del caulidio decrece hasta 120  $\mu\text{m}$ . La epidermis aumenta en número de estratos (4 ó 5), aunque en niveles muy basales vuelve a presentar dos o tres. La existencia de estratos de transición puede oscurecer algo la delimitación entre epidermis y parénquima. El grosor de la pared secundaria puede aumentar hasta colapsar el lumen de algunas células epidérmicas, alcanzando 3-4  $\mu\text{m}$ . Es frecuente la aparición de bandas concéntricas en el espesor de este estrato. En el interior, la pared secundaria muestra cierta desestructuración.

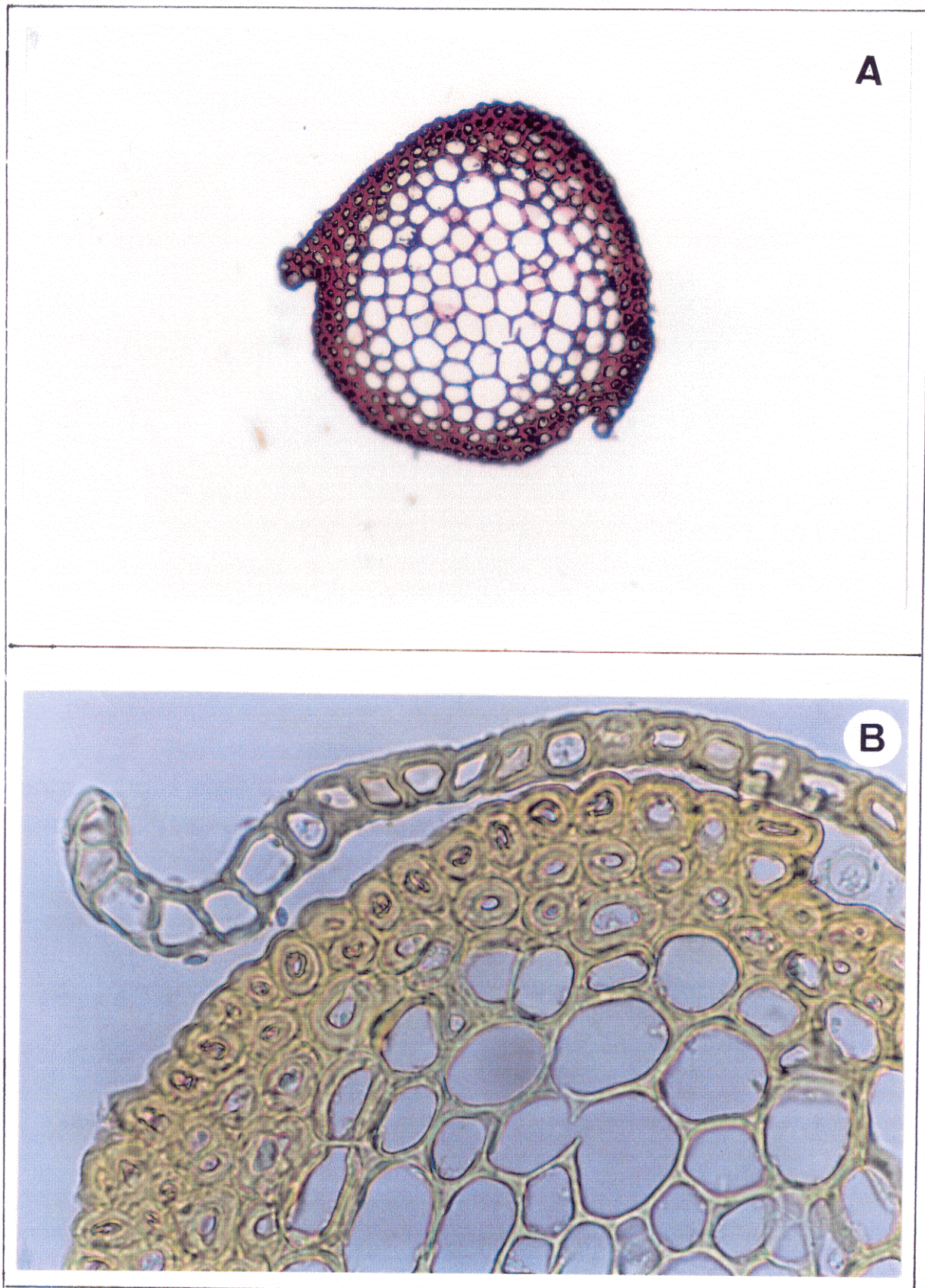
La cutícula se observa íntegra, y no aparecen señales de invasión de microorganismos, aunque se ha encontrado frecuentemente una vaina de tejido degenerado, de forma más o menos disgregada, circundando el caulidio.

La pared de las células parenquimáticas y epidérmicas, de color natural ocre, reacciona con fuerte intensidad para la detección de pectinas (fig. 4 B) y, especialmente, de sustancias fenólicas. La detección de celulosa requiere una semana de actuación de los reactivos, y aun así el resultado es débil, aunque es algo más marcado en el parénquima interno. En medios básicos la pared enrojece fuertemente, y en ácido sulfúrico concentrado se disuelve en pocos minutos. Los acúmulos de lípidos muestran estar formados por mezclas de neutros y ácidos.

---

**Fig. 4. A:** Corte transversal de caulidio medio de *Gr. hartmanii*. Test de detección de pectinas (rojo de rutenio), 220×. **B:** Corte transversal de caulidio apical de *Gr. hartmanii*, 850×.

---





#### *YEMAS*

Aparecen en el ápice de los caulidios, tienen forma de mora, con 20-30 células y un diámetro de 100  $\mu\text{m}$ . Las paredes constan sólo del estrato primario, que a su vez es biestratificado, con una banda fibrilar reticulada bordeada internamente por otra más difusa. Externamente están recurbiertas por una sustancia lipofílica amorfa.

Su comportamiento ante las reacciones histoquímicas es semejante al del caulidio, exceptuando la mayor resistencia al ácido sulfúrico concentrado (más de 24 horas).

#### *FILIDIO*

. Nivel basal: el nervio está formado por 6 células-guía adaxiales y tres estratos de estereidas abaxiales, con 8 células cada uno. Su contorno es semilunar, poco resaltado en el envés. El limbo tiene una anchura de 15-20 células, que son leptodermas, de paredes exteriores convexas y alargadas en sentido lateral. El margen es uniestrato y recurvado.

. Nivel medio: el nervio presenta 4-6 células-guía adaxiales y tres estratos de estereidas abaxiales, de 10-15 células cada uno. Su contorno es laxamente trilobulado, a veces irregular. El limbo tiene una anchura de 30 células isodiamétricas en sección transversal. El margen es poco recurvado, biestrato.

. Nivel apical: el número de células-guía adaxiales decrece hasta dos, y las estereidas aumentan progresivamente el diámetro de su lumen. Finalmente estos tipos celulares se igualan al parenquimático del limbo. El contorno del nervio es muy irregular. El limbo presenta un margen biestratificado en 2-3 filas de células.

La punta pilífera no es decurrente, está formada en corte transversal por un máximo de 20-30 células y es dentada.

Ante la luz polarizada la máxima actividad es la registrada por el cuarto basal del nervio y por el pelo.



***Gr. incurva***

*CAULIDIO*

Diámetro de cerca de 150  $\mu\text{m}$ .

La epidermis es uniestrata, a veces biestrata, de contorno bastante regular, formada por células de 15-30  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, y aproximadamente isodiamétricas, o levemente alargadas tangencialmente, con diámetro de 8-15  $\mu\text{m}$ , en corte transversal (fig. 5 B).

El parénquima consta de tres o cuatro estratos, de células de 30-40  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, más o menos isodiamétricas, con diámetro de 15-20  $\mu\text{m}$ , con los máximos valores en los estratos centrales, y los menores en el interno (fig. 5 B).

El hidroma es ligeramente excéntrico, de contorno regular, constituido por 6-10 células de 5-8  $\mu\text{m}$  de diámetro (fig. 5 B).

La epidermis y el parénquima poseen una pared primaria opaca, bordeada por un estrato fibrilar menos denso a los electrones, indistinguible en el parénquima interno (fig. 4 A). El grosor de la pared primaria es de 0,4  $\mu\text{m}$  en la epidermis, aunque hacia el interior se reduce a una línea muy delgada. En la periferia no se engruesa formando una corona diferenciada, excepto si se trata de un filidio.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar (fig. 5 A), a veces con dos o tres bandas. Ocasionalmente puede aparecer un segundo estrato interno laxo, más denso a los electrones. En la epidermis puede alcanzar 2  $\mu\text{m}$  de espesor, y va adelgazándose gradualmente hacia el interior hasta 0,3  $\mu\text{m}$ . El grosor es uniforme para una misma célula.

Se observan algunos plasmodesmos aislados, pero en su mayor parte aparecen en campos de punteaduras primarias, más abundantes en paredes transversales, pero también presentes en las longitudinales; igualmente distribuidos en la epidermis y el parénquima. Producen un adelgazamiento gradual de la pared, hasta un espesor final de 0,5-0,6  $\mu\text{m}$  (fig. 5 A).

---

La delimitación entre el parénquima y la epidermis es generalmente clara (fig. 5 B).

La pared de los hidroides muestra trígonos opacos, frecuentemente con áreas de perforaciones, bordeados por una banda fina de pared secundaria. Los lados aparecen muy desestructurados, laxos, fibrilares, con un grosor de 0,2  $\mu\text{m}$ , y muestran trazos discontinuos de la lámina media.

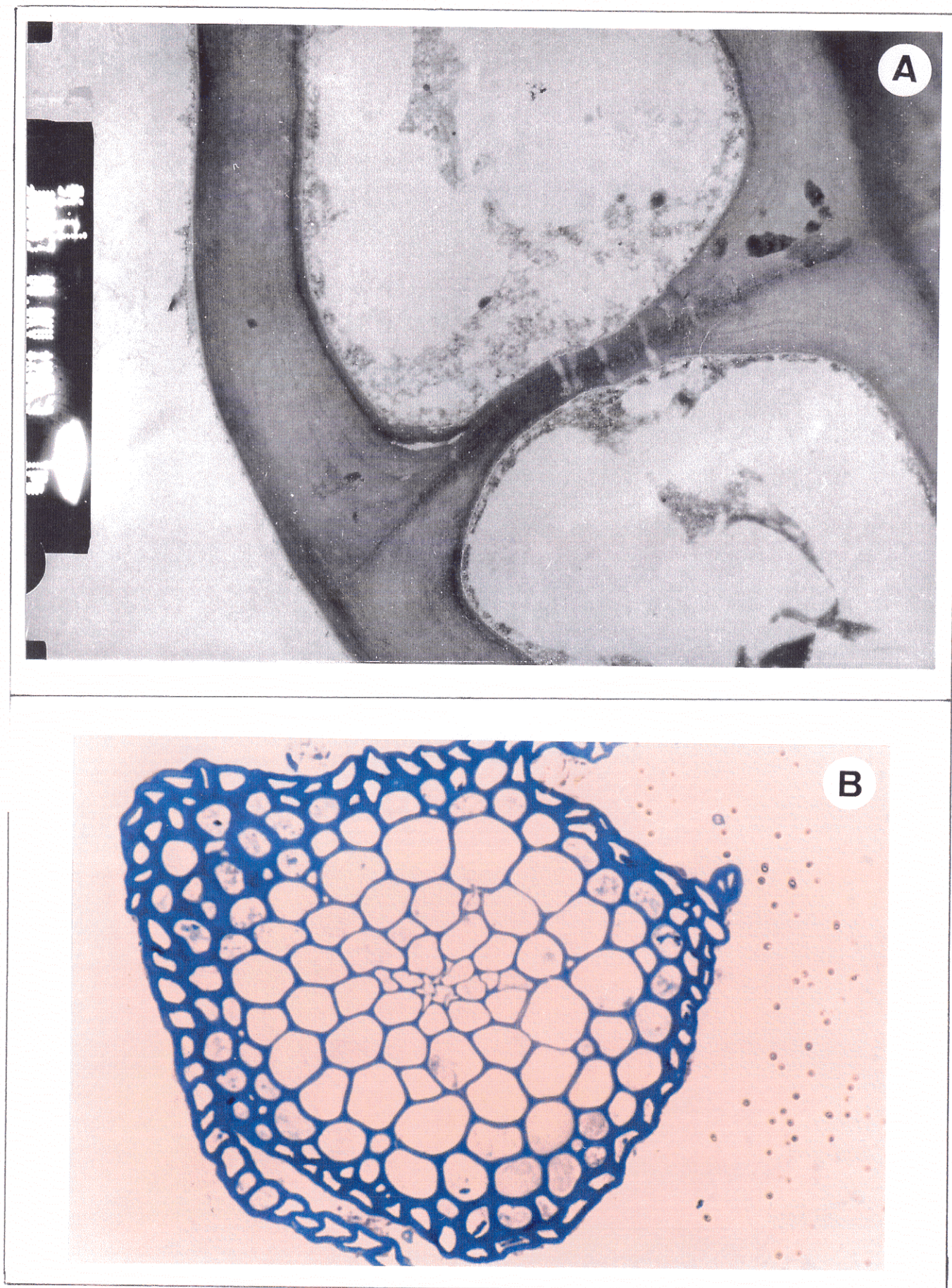
La actividad citoplasmática es muy escasa, sólo se encuentran acúmulos lipídicos y restos degradados de orgánulos. Aparecen señales de invasión de microorganismos, aunque sus células no se han observado.

---

**Fig. 5. A:** Corte transversal de caulidio de *Gr. incurva*: campo de punteaduras primarias en la epidermis, a MET. **B:** Corte transversal de caulidio apical de *Gr. incurva*, 600 $\times$ .

---









Hacia la base, el diámetro del caulidio se reduce hasta 100  $\mu\text{m}$ , a veces hasta 70  $\mu\text{m}$ . Las paredes de los hidroides pierden su estructura fibrilar, y se afinan a menos de 0,1  $\mu\text{m}$ . Finalmente desaparece el hidroma. La pared secundaria se engruesa hasta 2,5-3  $\mu\text{m}$  en la epidermis y 0,5 en el parénquima interno. Aunque se mantiene la cutícula, se observan abundantes microorganismos, de organización procariota sin pared celular (tipo micoplasma), hasta el interior del caulidio.

No se observa vaina de tejido degradado, o es muy reducida.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, las paredes celulares reaccionan fuertemente para la detección de pectinas, celulosa y fenoles (éstos, especialmente en la periferia). Las secciones, de color natural ocre-amarillento, enrojecen en disoluciones alcalinas, y se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado. El azul de Nilo muestra predominantemente acúmulos neutros.

#### *FILIDIO*

. Nivel basal: El nervio presenta dos células adaxiales poco diferenciadas y tres estratos de 4-8 estereidas cada uno hacia la cara abaxial. Su contorno es semilunar, destacando poco en dicha superficie. El limbo tiene una anchura de unas 15 células, es uniestrato y de margen ligeramente recurvado.

. Nivel medio: el nervio se compone de dos células-guía adaxiales, de dos estratos abaxiales de 8-10 estereidas cada uno, y de 1-2 estereidas interiores. Su contorno es redondeado, poco resaltado en el envés. El limbo tiene una anchura de 20-25 células, que se alargan en sentido lateral, de paredes convexas. Presenta ocasional biestratificación. El margen es asimétricamente recurvado y uniestrato.

. Nivel apical: el nervio y el limbro tienden a presentar exclusivamente células parenquimáticas, ovaladas en sentido anteroposterior. El margen es plano, biestrato en sus 2-4 últimas filas celulares.

No se han observado papilas en las células del filidio.

La punta pilífera no es decurrente, y las fibras presentan extremos patentes, produciendo dientes. En sección transversal se ve formada por un máximo de diez fibras.

Ante la luz polarizada, la máxima actividad la presenta el tercio basal del nervio y el pelo.

**Gr. orbicularis**

*CAULIDIO*

Diámetro de 150-200  $\mu\text{m}$ .

Se destaca la presencia de una cutícula muy delgada. La epidermis es de contorno bastante irregular, por la alta densidad de bases de filidios imbricadas, y está formada por 1-3 estratos de células de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, que en corte trasversal son aproximadamente isodiamétricas o algo alargadas tangencialmente, con un diámetro de 8-15  $\mu\text{m}$ .

El parénquima consta de 2-3 estratos de células de 25-50  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, isodiamétricas en su sección transversal, con un diámetro de 12-18  $\mu\text{m}$ , con los máximos valores en el estrato contiguo al más interno (fig. 6 B).

El hidroma presenta hasta 40 células en los caulidios fértiles, con un contorno más o menos regular. El diámetro de los hidroides en sección transversal es de 5-10  $\mu\text{m}$  (fig. 6 B).

En la epidermis y el parénquima, la pared primaria es opaca, con un estrato homogéneo que forma los trígonos y una banda más clara fibrilar que los bordea internamente, sólo distinguible en la epidermis. El grosor de la pared primaria es de 0,6  $\mu\text{m}$  en la periferia, y se constriñe a una fina línea en el interior (fig. 6 A). No se engruesa formando una corona externa, salvo en las regiones en las que se diferencia un filidio.

La pared secundaria es de mediana densidad electrónica, biestrata, con un estrato densamente fibrilar y otro interno reticular, más electrodensos. El grosor, de 2  $\mu\text{m}$  en la epidermis, disminuye gradualmente hasta 0,3  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno (fig. 6 A), y es bastante regular para cada célula.

Los plasmodesmos se encuentran principalmente agrupados en campos de punteaduras primarias, más abundantes en las paredes transversales del parénquima interno. Sólo ocasionalmente se han encontrado en la epidermis. Su presencia causa una disminución gradual del grosor de la pared, hasta alcanzar 0,5  $\mu\text{m}$ .

La transición entre el parénquima y la epidermis es bastante gradual, y es difícil distinguir este último tejido. Las paredes de los hidroides presentan trígonos homogéneos y muy opacos, rodeados por una fina banda de pared secundaria. Los lados presentan una estructura fibrilar, donde no se distingue la antigua estratificación de la pared, y son muy delgados (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ), aunque normalmente continuos (fig. 6 A). En el contacto con el parénquima la degradación sólo afecta a la pared secundaria de los hidroides.

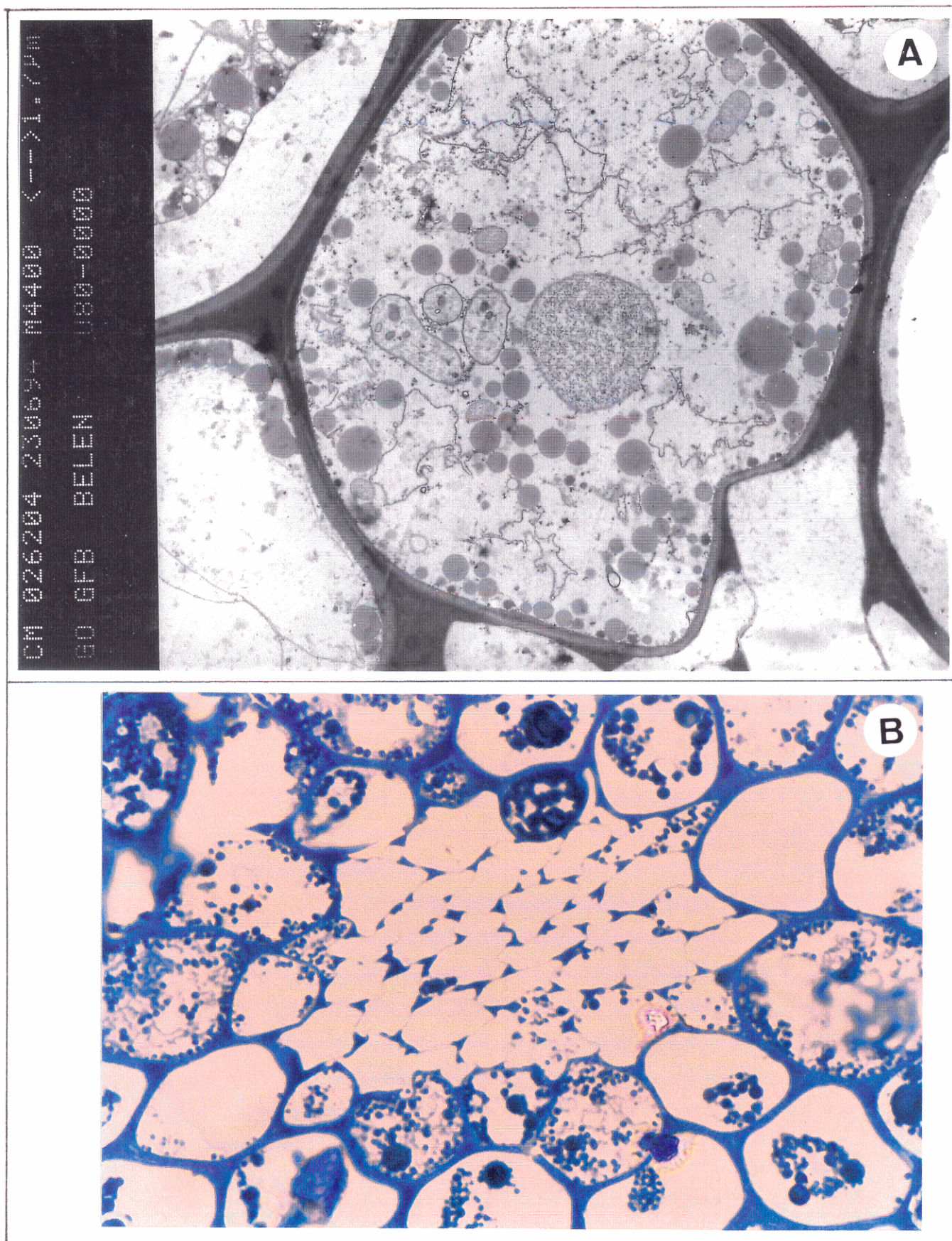
En el citoplasma aparecen cloroplastos bien organizados, de hasta 5  $\mu\text{m}$  de diámetro máximo, mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas, núcleo y nucléolo, así como grandes acúmulos lipídicos (fig. 6 A). Se han observado al microscopio óptico depósitos de cristales en las paredes de los hidroides.

---

**Fig. 6. A:** Corte transversal de caulidio de *Gr. orbicularis*: parénquima interno, a MET. **B:** Corte transversal de caulidio basal de *Gr. orbicularis*, teñido con azul de metileno, 1500 $\times$ .

---









Hacia la base el diámetro disminuye hasta 100-120  $\mu\text{m}$ . La cutícula se reduce mucho y puede desaparecer. En el hidroma tiende a decrecer el número de células, y a veces se colapsa totalmente, aunque se han encontrado secciones basales con 30 hidroides. Se elimina por completo la diferenciación entre epidermis y parénquima. Se observa una alta degradación de las paredes celulares, que no se engruesan apreciablemente. El estrato interno de la pared secundaria aumenta de espesor y adquiere una estructura homogénea. Es frecuente observar roturas y discontinuidades en los tabiques.

Disminuye la actividad citoplasmática, aunque algunas células parenquimáticas muestran aún alta organización.

Se han observado microorganismos en el interior de las paredes periféricas.

No se ha encontrado una vaina de tejido degradado circundado el caulidio.

En cuanto a las reacciones histoquímicas se detecta con intensidad la presencia de sustancias pécticas, celulosa y fenoles. Las paredes, de color natural ocre se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado y dan una reacción anaranjada en la epidermis y rojiza en el parénquima en medios alcalinos. Los acúmulos de lípidos pueden estar constituidos por ácidos, neutros o mezclas.

*FILIDIO*

. Nivel basal: el nervio consta de dos células-guía adaxiales, 2-4 células internas semejantes a éstas y 2-3 estratos de abaxiales de cerca de 8 estereidas cada uno. El contorno es semilunar, con cierto resalte en el envés. El limbo tiene una anchura de 20-30 células, que se observan alargadas en sentido lateral, con las paredes externas convexas. El margen es uniestrato, recurvado.

. Nivel medio: en el nervio aparecen 2 células-guía adaxiales, 6-7 células parenquimáticas abaxiales, algo más reducidas que el limbo, y una capa interna de tres células, separadas por tabiques muy delgados. El contorno del nervio es redondeado y sobresale poco en el envés. El limbo, siempre uniestrato, alcanza las 30 células de anchura, que hacia el ápice presentan convexa la pared adaxial. Frecuentemente las uniones intercelulares son protuberantes a modo de papilas. Ambos márgenes son uniestratos e igualmente recurvados.

. Nivel apical: todas las células se igualan al tipo parenquimático del limbo. Se hace más frecuente la presencia de prórulas intercelulares. El margen y el limbo son irregularmente biestratos.

La punta pilífera es un poco decurrente, lisa o levemente dentada, con un máximo de 35-40 fibras en sección transversal.

La máxima actividad ante la luz polarizada era la registrada por la base, la mitad basal del nervio y el pelo.

***Gr. pulvinata***

*CAULIDIO*

Diámetro de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ .

La epidermis es uniestrata, ocasionalmente con dos estratos y muy raramente tres, poco diferenciada, con células de 30  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, aproximadamente isodiamétrica en sección transversal, con diámetro de 12-18  $\mu\text{m}$  (fig. 7 B).

El parénquima consta de 3-4 estratos de células de 30-50  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, con diámetro de cerca de 20  $\mu\text{m}$ , en sección transversal, donde los máximos valores corresponden al estrato contiguo al más interno (fig. 7 B).

El hidroma tiene un contorno bastante regular, y está constituido por unos 30 hidroides de 4-15  $\mu\text{m}$  de diámetro (fig. 7 B).

Las células parenquimáticas y epidérmicas presentan una pared primaria con un estrato muy opaco, de estructura indistinguible, que forma los trígonos, y una banda fibrilar que los bordea internamente. La pared primaria alcanza en la epidermis un grosor de 0,8  $\mu\text{m}$  en la epidermis, y queda reducida a una fina línea hacia el interior (fig. 7 A). No forma una corona periférica engrosada, salvo en los filidios en diferenciación.

La pared secundaria es uniestrata, medianamente electrondensa, muy densamente fibrilar. Ocasionalmente se diferencia un segundo estrato interno de organización reticular. La pared secundaria alcanza un grosor de 2  $\mu\text{m}$  en la epidermis, y decrece gradualmente hasta 0,3  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno (fig. 7 A). El espesor de este estrato es muy regular para cada célula.

Se observan plasmodesmos aislados entre las paredes parenquimáticas y epidérmicas, pero más frecuentemente aparecen agrupados en campos de punteaduras primarias, preferentemente distribuidos en paredes transversales. Causan un adelgazamiento gradual de la pared contigua, hasta presentar 0,3-0,4  $\mu\text{m}$  de espesor.

La transición entre la epidermis y el parénquima es bastante gradual (fig. 7 B).

Los hidroides presentan trígonos muy opacos de apariencia homogénea, bordeados por una fina banda de pared secundaria. Los lados presentan una estructura fibrilar laxa, donde a veces se distinguen restos de la lámina media, con un grosor total de 0,3  $\mu\text{m}$ . En el contacto con el parénquima interno la degradación de la pared no afecta ni a la célula parenquimática ni a la pared primaria del hidroide (fig. 7 A).

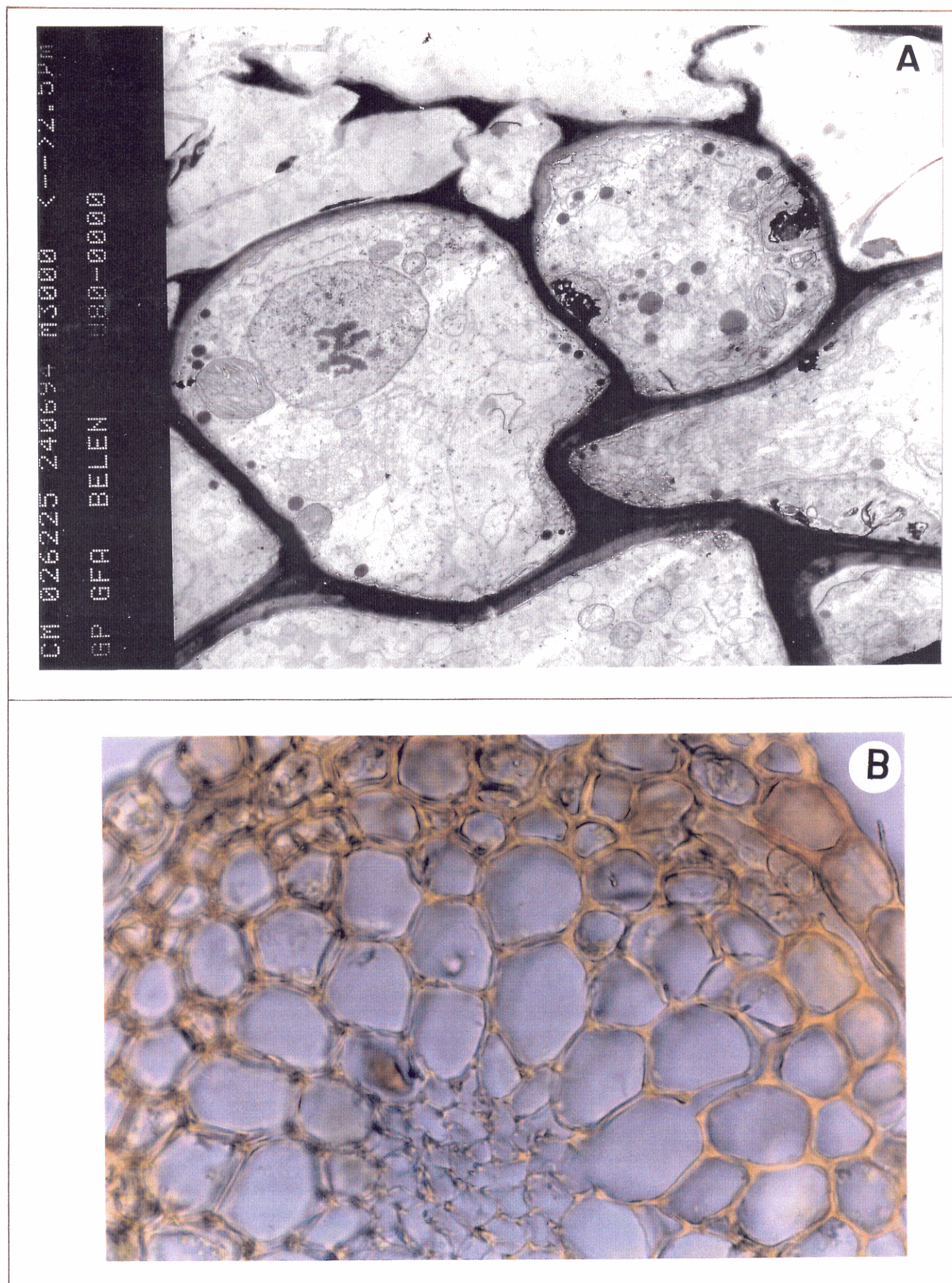
El citoplasma aparece altamente organizado, con cloroplastos de pequeño tamaño (2-3  $\mu\text{m}$ ), cisternas de retículo endoplasmático, dictiosomas, núcleo con nucléolo, etc. Sin embargo, las células periféricas muestran signos de degeneración citoplasmática, con abundantes guirnalda concéntricas de retículo endoplasmático, estructuras residuales y alto grado de vacuolización (fig. 7 A). Con microscopía óptica se han observado depósitos de cristales en algunos hidroides. No se han registrado señales de invasión de microorganismos.

---

Fig. 7. A: Corte transversal de caulidio de *Gr. pulvinata*: parénquima interno, a MET. B: Corte transversal de caulidio basal de *Gr. pulvinata*, sin teñir, 600 $\times$ .

---









En niveles más basales el diámetro del caulidio se reduce hasta 100  $\mu\text{m}$ . El hidroma tiende a colapsar, decreciendo su número de células o formando una laguna central. Sus paredes se hacen frecuentemente discontinuas, amorfas, con alta densidad electrónica.

Se produce una mayor pérdida de actividad en las células, especialmente en las epidérmicas, lo que contribuye a la mayor diferenciación de este tejido. El parénquima, aunque altamente vacuolizado, mantiene algunos orgánulos, así como abundantes acúmulos lipídicos.

En la pared secundaria se diferencia casi siempre un segundo estrato reticulado. Es frecuente, asimismo, la aparición de bandas en el estrato principal.

No se ha observado ni presencia de microorganismos ni vaina de tejido degradado circundando el caulidio.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, se detecta con intensidad la presencia de pectinas, celulosa y sustancias fenólicas. La pared, de color originalmente ocre, enrojece fuerte y uniformemente en medios alcalinos, y se disuelve en pocos minutos con ácido sulfúrico concentrado. Los lípidos se localizan con preferencia en los extremos apical y basal, y tienden a mezclarse los ácidos y los neutros.

*FILIDIO*

. Nivel basal: en el nervio aparecen dos células-guía adaxiales, dos estratos de cerca de 6 estereidas cada uno en el envés (el periférico, de células mayores), y 2-4 células centrales de paredes muy finas, de apariencia semejante a los hidroides del caulidio. El contorno del nervio es semilunar, con cierto resalte en la superficie abaxial. El limbo posee 25-30 células leptodermas, isodiamétricas, con las paredes adaxiales y abaxiales convexas. El margen es uniestrato y plano.

. Nivel medio: el nervio se compone de dos células-guía adaxiales, una capa abaxial de células parenquimáticas, algo menores que las del limbo, una capa interna de estereidas y 2-3 células centrales semejantes a hidroides. El contorno es redondeado, con resalte poco acusado del envés del filidio. El limbo tiene una anchura hasta de 40 células, con el lumen ovalado, alargado en sentido anteroposterior, con el margen recurvado, biestrato en la última o dos últimas filas de células.

. Nivel apical: el filidio presenta exclusivamenate células parenquimáticas, con dos capas en el nervio. El limbo es casi siempre uniestrato hasta el margen, que es como en el nivel medio.

No se han obsevado papilas en las superficies del filidio, pero ocasionalmente han aparecido formas anómalas con dos nervios.

La punta pilífera es algo decurrente, lisa, con 30-40 fibras densamente empaquetadas.

Ante la luz polarizada la base del filidio, los dos tercios basales del nervio y la punta pilífera registran la máxima actividad.

***Gr. retracta***

**CAULIDIO**

Diámetro de 200-250  $\mu\text{m}$ .

La epidermis presenta 2-4 estratos, con células de 100-120  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, o levemente alargadas tangencialmente, con diámetro de 10-15  $\mu\text{m}$ , en sección transversal (fig. 8 A).

El parénquima está formado por 3-4 estratos de células, de 100-120  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, y que en sección transversal son isodiamétricas, con un diámetro de 15-25  $\mu\text{m}$ , donde los mínimos valores corresponden a las más internas (fig. 8 A).

El hidroma tiene un contorno irregular y está formado por hasta 40 células de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro en sección transversal (fig. 8 A).

Las células epidérmicas y parenquimáticas poseen una pared primaria con un estrato opaco, homogéneo, que forma los trígonos, y otro fibrilar que lo bordea internamente, sólo visible en las capas externas del caulidio. El grosor total de la pared primaria alcanza 0,5  $\mu\text{m}$  en la periferia y decrece hasta 0,2  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno. No se diferencia en una corona externa especialmente engrosada, salvo si corresponde a un filidio en diferenciación.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, medianamente opaca a los electrones. A veces presenta una subestratificación en bandas delimitadas por finas líneas opacas, y sólo ocasionalmente se diferencia un estrato reticular, más denso a los electrones, hacia el interior del caulidio. En la epidermis, la pared secundaria alcanza un grosor de 1-1,5  $\mu\text{m}$ , que disminuye gradualmente hacia el interior hasta 0,3  $\mu\text{m}$ . El espesor es constante para una misma célula.

Los plasmodesmos presentes nunca se han observado agrupados en campos de punteaduras primarias. Aparecen con mucha abundancia en las paredes transversales, que, aunque su espesor se limita a 0,5  $\mu\text{m}$ , no muestran diferencias de grosor con paredes similares no perforadas, y mantienen su estructura y organización (fig. 8 C). En ocasiones se encuentran en las paredes longitudinales, que se adelgazan ligeramente, aunque sus espesores pueden ser superiores a 1  $\mu\text{m}$ .

La delimitación entre la epidermis y el parénquima es bastante clara (fig. 8 A).

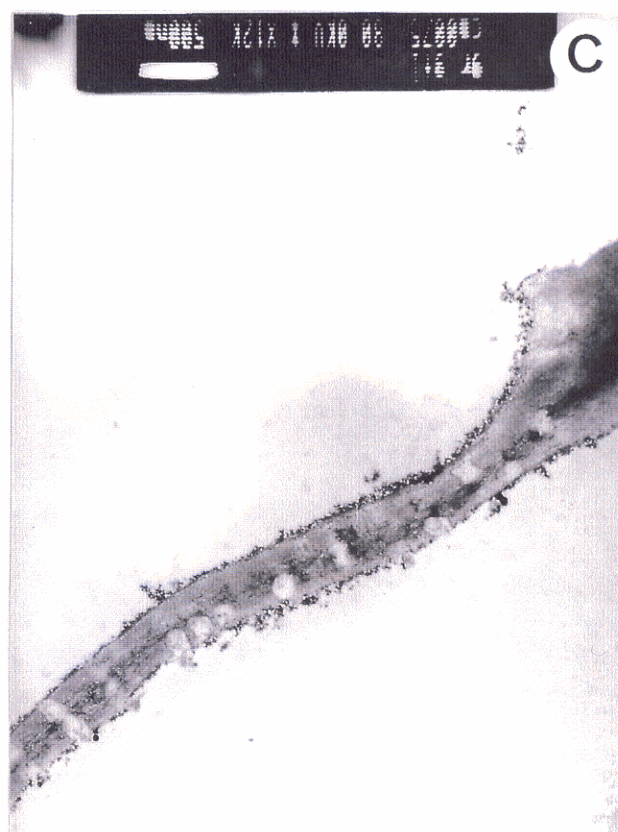
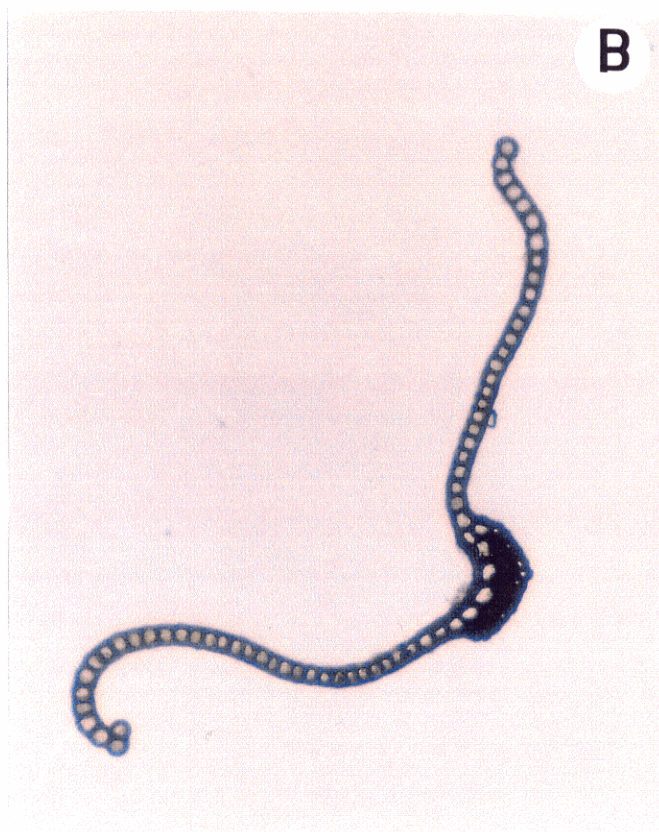
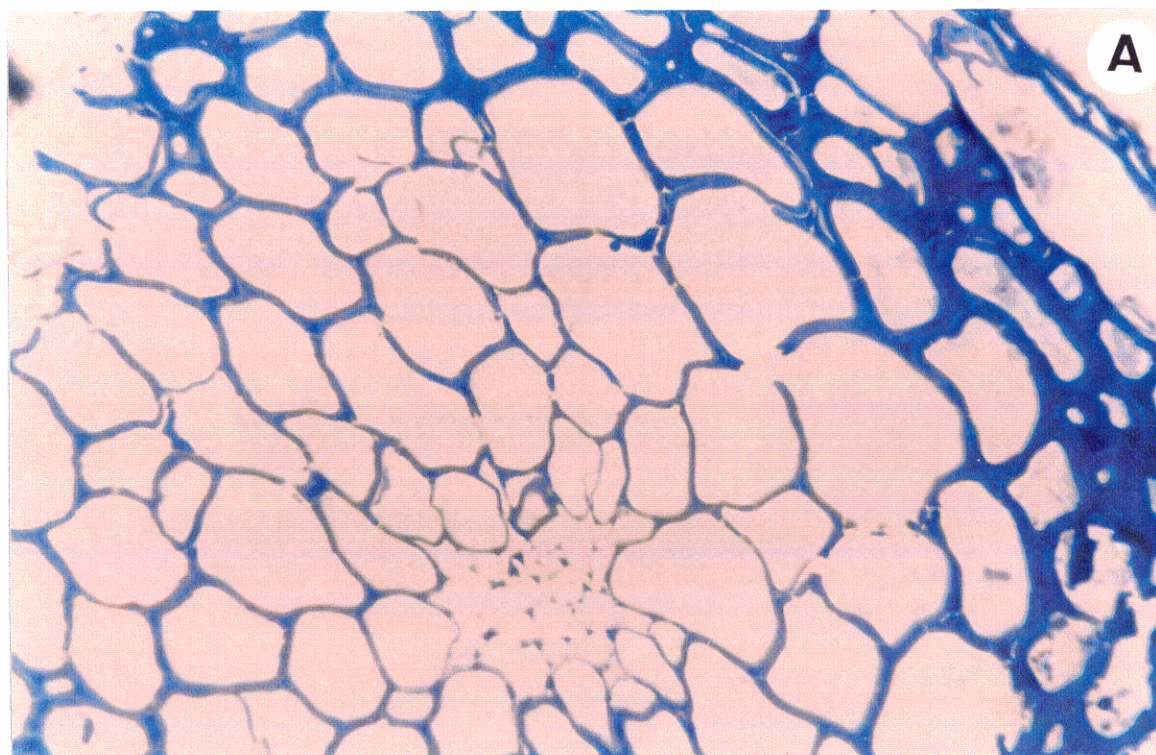
Los hidroides presentan trígonos muy densos bordeados por una fina banda de pared secundaria. Los lados, con un grosor de 0,2  $\mu\text{m}$ , presentan una estructura muy laxa, en la que de forma discontinua se diferencia la lámina media.

En el contacto con el parénquima, la degradación de la pared afecta sólo a las paredes secundarias correspondientes al hidroma.

---

**Fig. 8.** A: Corte transversal de caulidio medio de *Gr. retracta*, teñido con azul de metileno, 600 $\times$ . B: Corte transversal de filidio de *Gr. retracta* (nivel medio). Test de detección de sustancias fenólicas ( $\text{FeCl}_3$ ), 220 $\times$ . C: Pared celular transversal del parénquima, a MET.

---





El citoplasma muestra un alto grado de degeneración y vacuolización, aunque se observan cloroplastos de 1-2  $\mu\text{m}$ , acúmulos de lípidos, mitocondrias y restos de membranas.

No se han observado señales de invasión de microorganismos.

Hacia la base tiende a degenerar la traza central, haciéndose discontinuas sus paredes y en ocasiones adelgazándose por debajo de 0,1  $\mu\text{m}$ . Se mantiene la cutícula, y las paredes secundarias no se engruesan sustancialmente, aunque presentan con más frecuencia una estructura en bandas. Se observan abundantes microorganismos en el lumen celular y en el interior de las paredes. El caulidio está circundado por una fina vaina de tejido degradado con gran abundancia de microorganismos.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, la prueba para la detección de celulosa da un resultado positivo en la pared secundaria, quedando la primaria sin reaccionar. Se detecta con intensidad la presencia de sustancias fenólicas (especialmente en la periferia) y de pectinas. Las paredes, de color natural ocre-verdoso en el ápice y pardo-rojizo en la base, viran a un rojo fuerte en medios alcalinos, y se disuelven en pocos minutos en ácido sulfúrico concentrado. Los acúmulos lipídicos presentan mezclas de ácidos y neutros.

#### *FILIDIO*

. Nivel basal: el nervio se compone de 6 células-guía adaxiales y de 3 estratos de estereidas, con 15-16 células el externo, y 5 ó 6, irregularmente dispuestas, el interno. Su contorno es semilunar, con mediano resalte del envés. El limbo tiene una anchura de 15-20 células, que son leptodermas, con paredes externas convexas y algo mayores en el margen, que es plano y uniestrato.



. Nivel medio: el nervio consta de 4-6 células adaxiales, de un estrato abaxial de células en transición de estereidas a parenquimáticas, y de 2-3 estratos de estereidas centrales. Su contorno es muy laxamente trilobular, y resalta abruptamente del envés del filidio. El limbo posee hasta 35-40 células, y es uniestrato salvo, ocasionalmente, en las 2-4 últimas filas marginales. El margen es ligero y asimétricamente recurvado (fig. 8 B).

. Nivel apical: el nervio consta de 2-4 células adaxiales y de un estrato abaxial. Todas las células tienden a uniformarse con el parénquima del limbo, aunque a veces queda alguna estereida central. El limbo está formado por células de lumen oblongo, alargado en sentido anteroposterior, y la biestratificación se extiende a las 5-10 filas de células marginales.

No se han observado papilas ni relieves similares.

La punta pilífera no es decurrente, es denticulada, y en corte transversal aparece formada por un máximo de 10 células.

Con respecto a la luz polarizada, la máxima actividad la muestra el tercio basal del nervio y el pelo.



**Gr. torquata**

**CAULIDIO**

Diámetro de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

La epidermis está formada por 2-3 estratos, con un contorno bastante regular. Sus células miden 30-50  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, y son más o menos isodiamétricas, o levemente alargadas tangencialmente en la periferia, con diámetro de 5-10  $\mu\text{m}$ , en sección transversal (fig. 9 B).

El parénquima está formado por dos estratos de células de 30-50  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, con diámetro de 12-15  $\mu\text{m}$ , bastante semejantes entre sí, en sección transversal (figs. 9 A, B).

El hidroma presenta un contorno bastante regular, y consta de 6-10 células con un diámetro de 1-7  $\mu\text{m}$  (fig. 9 B).

Las células parenquimáticas y epidérmicas poseen una pared primaria consistente en un estrato denso que forma los trígonos, bordeado por una casi inconspicua banda fibrilar (fig. 9 A). Su grosor es de 0,3  $\mu\text{m}$  en la periferia, y se reduce a una línea muy delgada en el interior.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, relativamente densa a los electrones. Con frecuencia aparece subdividida en bandas paralelas. Ocasionalmente está delimitada al interior por una línea más opaca (fig. 9 A). Su grosor, muy uniforme para cada célula, es de 0,8  $\mu\text{m}$  en la epidermis, y se reduce gradualmente hasta 0,2 en el parénquima interno.

Las células se comunican por algunos plasmodesmos sueltos, pero más frecuentemente se agrupan en campos de punteaduras primarias, que son más abundantes en las paredes transversales del parénquima. La presencia de estos campos causa un adelgazamiento muy gradual de la pared, hasta alcanzar 0,6  $\mu\text{m}$ .

La transición entre la epidermis y el parénquima es relativamente brusca (fig. 9 B).

Los hidroides presentan trígonos con aspecto laxo, frecuentemente perforados, bordeados por una pared secundaria relativamente opaca de estructura fibrilar muy laxa. En los lados, de 0,1  $\mu\text{m}$  de grosor, se mantiene la lámina media. En las paredes de los hidroides adyacentes al parénquima interno se conserva la estructura del estrato primario.

El citoplasma contiene cloroplastos de 2-4  $\mu\text{m}$ , mitocondrias, núcleo con nucléolo, retículo endoplasmático, etc. Hacia la periferia tiende a degenerarse, y aparece vacuolizado. Los acúmulos de lípidos son muy abundantes, incluso en los hidroides.

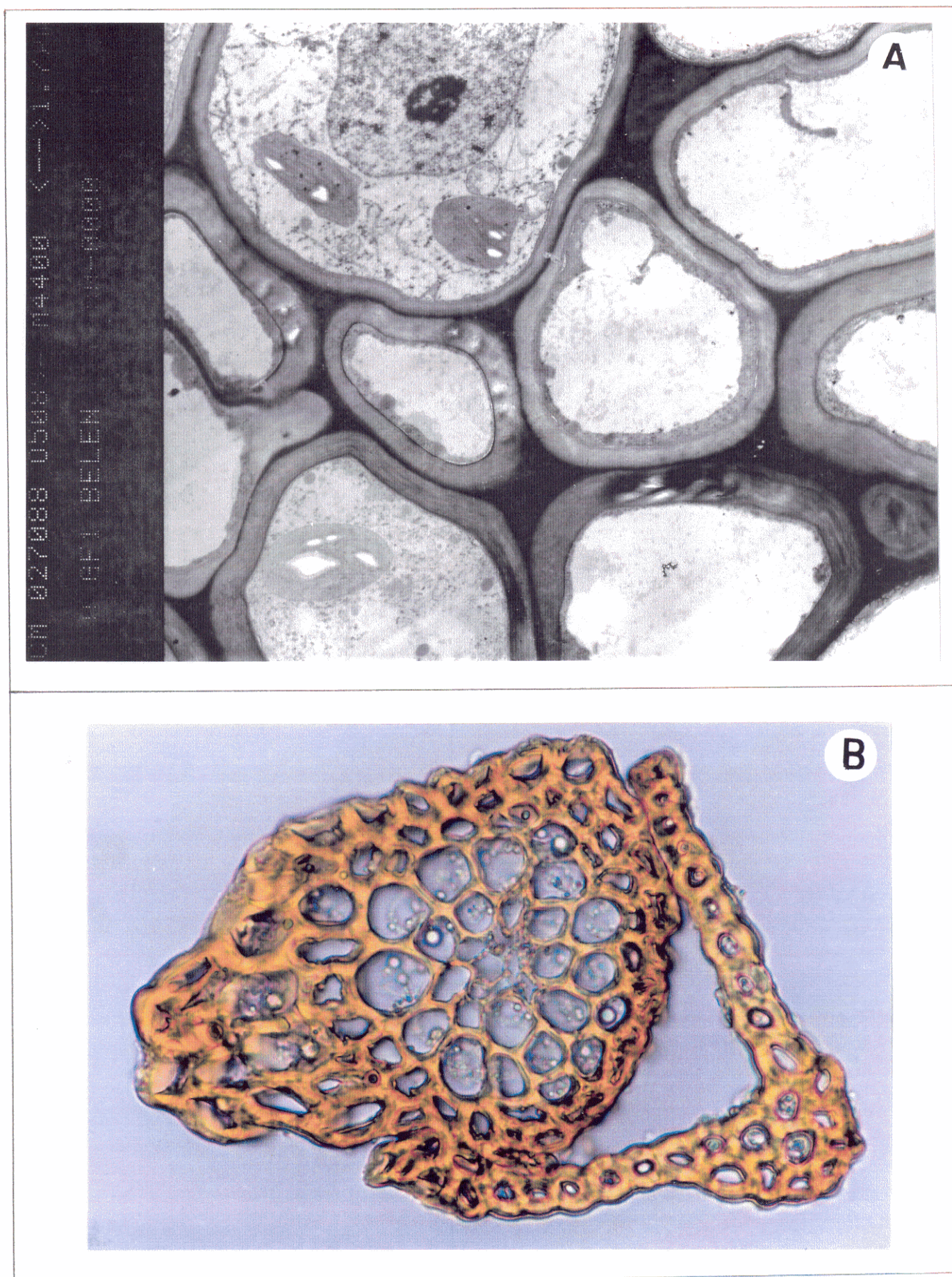
No se han observado señales de invasión de microorganismos.

---

**Fig. 9. A:** Corte transversal de caulidio medio de *Gr. torquata*, epidermis y parénquima externo, a MET. **B:** Corte transversal de caulidio de *Gr. torquata* (nivel medio), sin teñir, 850 $\times$ .

---









Hacia la base el diámetro del caulidio se reduce a 75  $\mu\text{m}$ , se desorganiza el citoplasma, especialmente en la periferia, aunque se mantienen los acúmulos lipídicos. Se desestructura la pared de los hidroides, aumentando las perforaciones, y llegando a colapsar por completo la traza. En la pared secundaria de la epidermis del parénquima se desarrollan más frecuentemente las bandas paralelas, así como un segundo estrato de estructura laxamente reticular. Desaparece la cutícula, y en las células periféricas se observan microorganismos en el lumen celular y en las paredes. El caulidio está circundado por una espesa vaina (hasta 70  $\mu\text{m}$  de grosor) de tejido degenerado, con abundantes microorganismos, que en estado hidratado le da al caulidio una textura gelatinosa.

La reacción para la celulosa se produce con intensidad muy débil. Se detectan sustancias fenólicas en la periferia, y la pectina se localiza abundantemente en todas las paredes. Éstas, de color natural amarillo-ocre, enrojecen fuertemente en disoluciones básicas y se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado. Los acúmulos lipídicos son predominantemente ácidos o neutros.

#### *YEMAS*

Son de forma irregular, de aproximadamente 75  $\mu\text{m}$ , compuestas por 20-30 células. Su pared consta sólo de un estrato primario, de estructura fibrilar-reticular, con un grosor de hasta 3  $\mu\text{m}$  fig. 10 A). En su periferia se localiza una cubierta lipofílica de espesor irregular.

Se comportan de igual manera que el caulidio en las pruebas histoquímicas, excepto en que resisten hasta 24 horas en ácido sulfúrico concentrado, antes de desorganizarse.

**FILIDIO**

. Nivel basal: el nervio consta de dos células adaxiales muy poco diferenciadas, de una capa abaxial de 5-6 células, y de 1-2 células centrales, todas ellas de aspecto parenquimático. El limbo tiene una anchura de 8-11 células de paredes externas convexas, con el margen unido a la epidermis del caulidio.

. Nivel medio: el nervio consta de dos células adaxiales (a veces una sola), de aspecto semejante al de las estereidas, y de dos estratos abaxiales de 3-4 estereidas, de las que las externas son a menudo protuberantes e irregulares. El contorno del nervio es a veces crenulado, con escaso resalte en el envés del filidio, y otras extremadamente irregular. El limbo tiene una anchura de 10-15 células, con el margen uniestrato, plano o ligeramente recurvado, con células de paredes externas convexas.

. Nivel apical: el nervio se compone únicamente de 3-5 células, similares entre sí, algo más engrosadas que el resto. El limbo es siempre uniestrato, con margen plano.

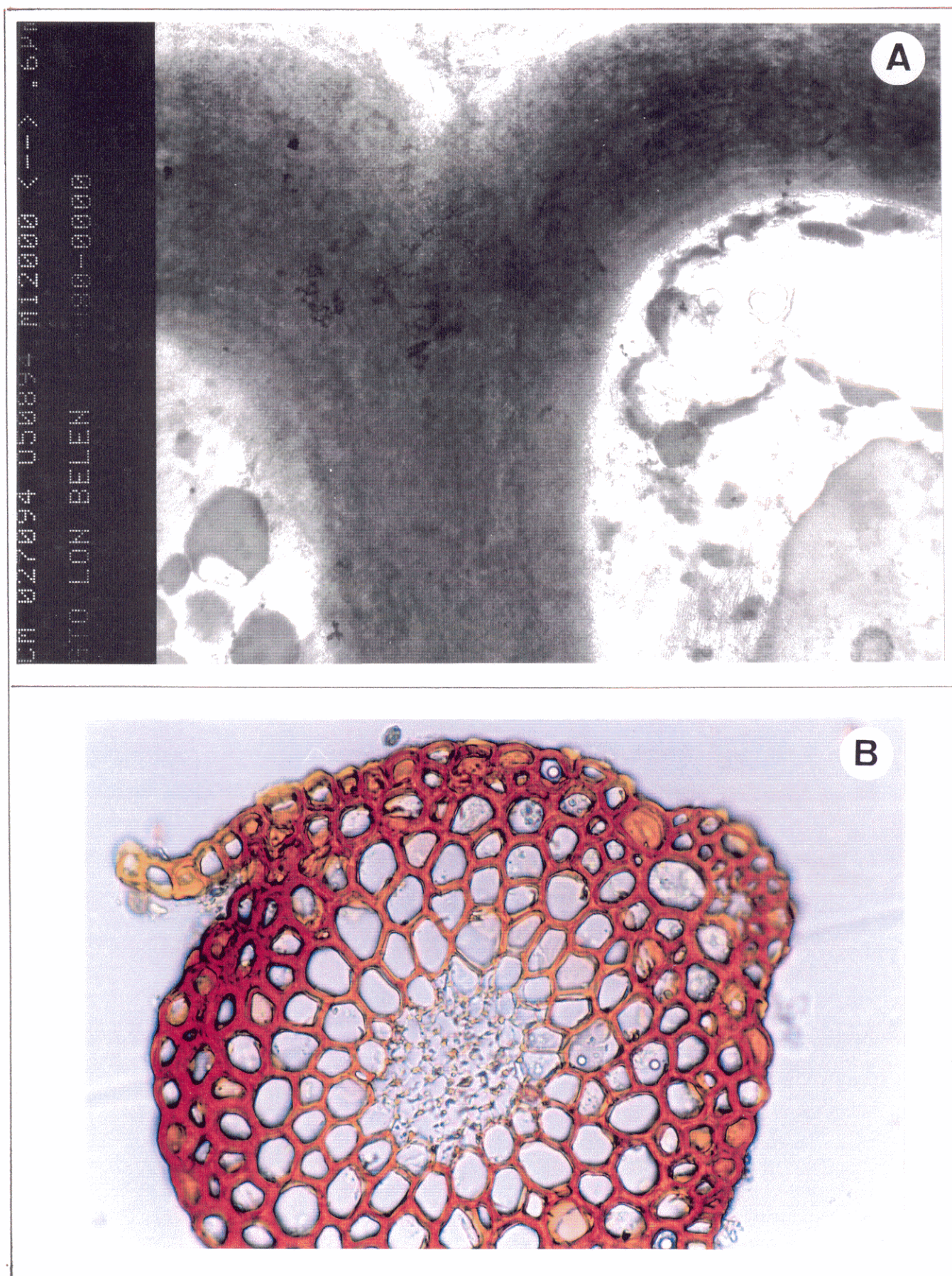
No se observan papilas propiamente dichas, pero prórulas en las uniones entre dos células.

---

**Fig. 10. A:** Corte de yema de *Gr. torquata*, a MET. **B:** Corte transversal de caulidio apical de *Gr. trichophylla*, reacción con potasa, 600×.

---









La punta pilífera se presenta con escasa frecuencia, es lisa y no decurrente. En corte transversal presenta un máximo de 5-7 fibras.

Con respecto a la luz polarizada, la base del filidio, el nervio completo y el pelo registran la máxima actividad.

***Gr. trichophylla***

*CAULIDIO*

Diámetro de 150-200  $\mu\text{m}$ .

La epidermis presenta 1-3 estratos de células de 20-30  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas o un poco alargadas tangencialmente, con diámetro de 10-15  $\mu\text{m}$ , en sección transversal (fig. 10 B).

El parénquima está formado por 2-4 estratos de células de 30-40  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, isodiamétricas en sección transversal, con diámetro de 15-25  $\mu\text{m}$ , donde los máximos valores corresponden a las más internas (fig. 10 B).

La traza de hidroides es de contorno regular y consta de 20-25 células de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro en sección transversal (fig. 10 B).

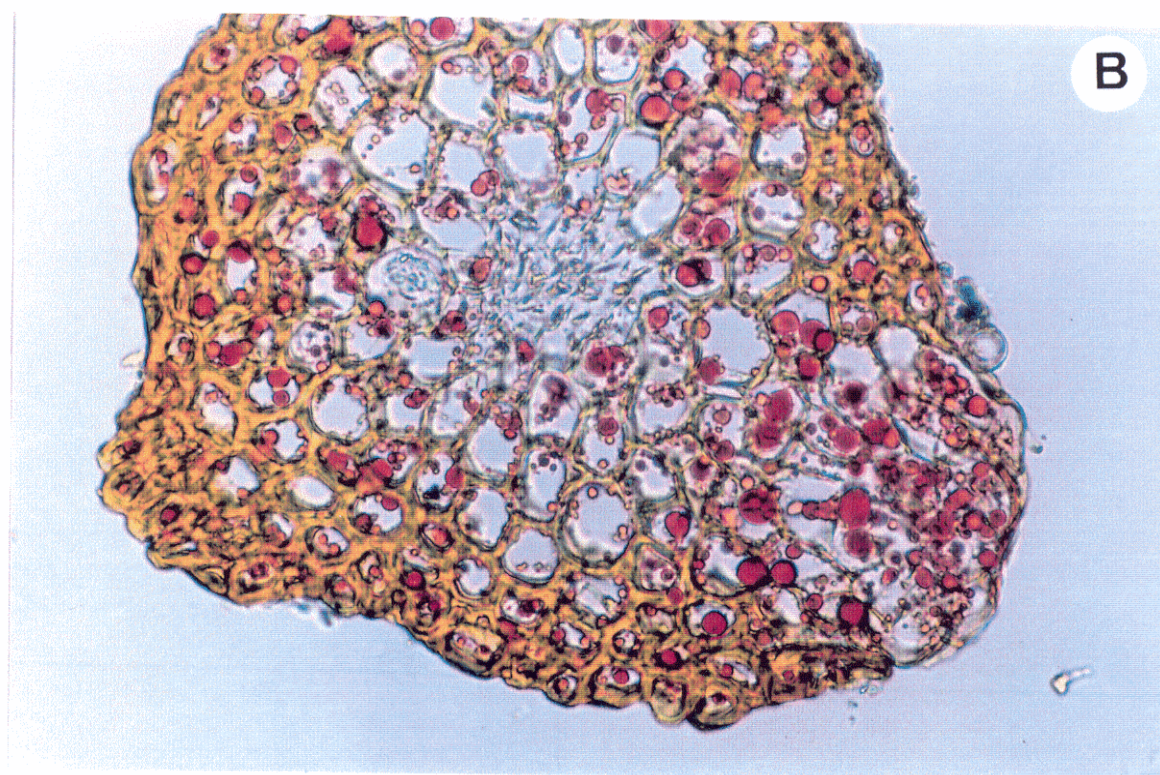
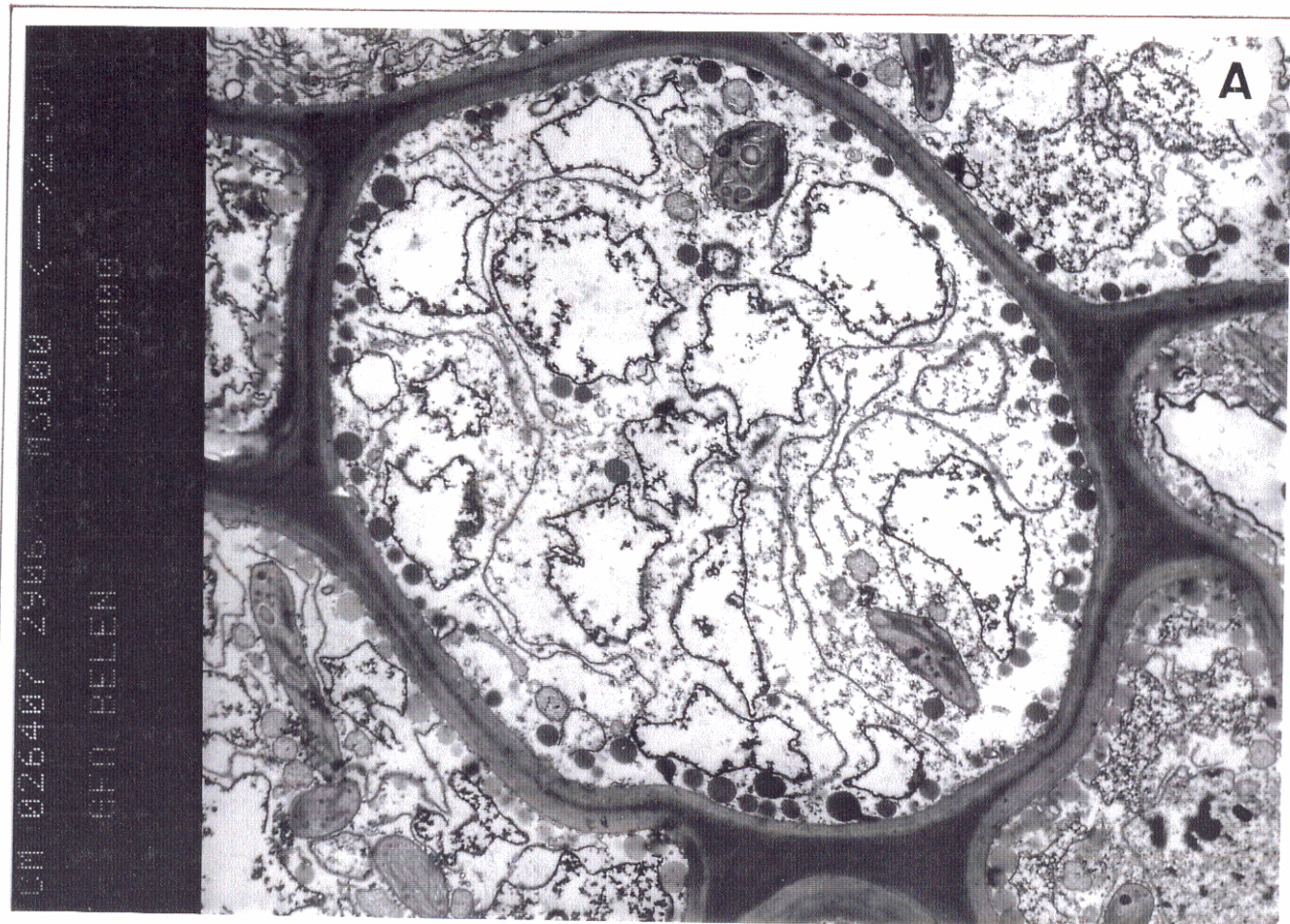
En la epidermis y el parénquima, la pared celular primaria aparece uniestrata, u ocasionalmente, en la epidermis, bordeada por una banda difusa. Su grosor es de 0,6  $\mu\text{m}$  en la periferia, y se constriñe a una línea hacia el interior (fig. 10 A). No forma una corona externa diferenciada, salvo en el arco correspondiente a la diferenciación de un filidio.

---

**Fig. 11. A:** Corte transversal de caulidio de *Gr. trichophylla*, a MET. Se observan figuras de degradación citoplasmática. **B:** Corte transversal de caulidio apical de *Gr. trichophylla*. Test de detección de lípidos (Sudán III), 600 $\times$ .

---









La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, subdividida en 2-3 bandas con variable separación. A veces, sobre todo en la periferia, se diferencia un estrato interno laxamente reticulado. Su grosor, constante para una misma célula, es de 1,5  $\mu\text{m}$  en la epidermis, y se reduce hacia el interior hasta 0,3  $\mu\text{m}$  (fig. 11 A).

Se observan algunos plasmodesmos aislados, pero en su mayor parte se agrupan en campos de punteaduras primarias, que aparecen preferentemente en las paredes transversales, y que causan un adelgazamiento gradual de la pared hasta alcanzar 0,5-0,6  $\mu\text{m}$ .

La delimitación entre la epidermis y el parénquima es clara (fig. 10 B).

Los hidroides presentan trígonos de estructura amorfa, bordeados por una pared secundaria muy fina y laxa. Los lados, con un grosor de 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ , son poco densos a los electrones, homogéneamente fibrilares, laxos, sin que se distinga estratificación o restos de lámina media. En la pared adyacente al parénquima interno se mantiene la estructura de la pared primaria.

En el citoplasma aparecen abundantes cloroplastos de hasta 5  $\mu\text{m}$  de longitud, mitocondrias y abundantes lípidos, pero el retículo endoplasmático forma guiraldas concéntricas y se aprecia un alto grado de vacuolización (fig. 11 A). No se han observado señales de invasión de microorganismos.

Hacia la base el diámetro se reduce a 100  $\mu\text{m}$ , desaparece la organización citoplasmática, aunque permanecen los acúmulos lipídicos (fig. 11 B); se degrada la traza de hidroides, a menudo dejando en su lugar una laguna central. Se engruesa la pared secundaria epidérmica hasta alcanzar 3  $\mu\text{m}$ , y tiende a desestructurarse. Desaparece la cutícula, y se observan abundantes microorganismos en los tejidos del caulidio. No se aprecia la presencia de una vaina de tejido degenerado alrededor del caulidio.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, se detecta con intensidad la presencia de sustancias fenólicas (especialmente en la periferia), de pectinas y de celulosa. Las paredes, de color natural ocre-amarillo, enrojecen fuertemente en disoluciones básicas y se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado. Predominan los acúmulos lipídicos ácidos o las mezclas de neutros y ácidos.

#### *YEMAS*

Son globulares, de 3-6 células, de 30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Sus paredes presentan sólo el estrato primario, que es reticular-fibrilar, con un grosor de 2-3  $\mu\text{m}$ ; y están rodeadas externamente por una vaina lipofílica irregular.

Su comportamiento es igual que el de caulidio en las reacciones histoquímicas, salvo en su mayor resistencia en ácido sulfúrico concentrado (hasta 24 horas).

#### *FILIDIO*

. Nivel basal: el nervio se compone de dos células-guía adaxiales, de dos estratos de 6-7 estereidas cada uno, y de 1-2 células centrales de paredes muy finas, semejantes a hidroides. El limbo tiene una anchura de 15 células, que son leptodermas, alargadas en sentido lateral, con las paredes externas convexas. El margen es uniestrato y plano o levemente recurvado.

. Nivel medio: el nervio consta de cuatro células-guía adaxiales, de dos estratos de estereidas abaxiales y de 3-4 células semejantes a hidroides. Su contorno es laxamente trilobulado, y resalta medianamente del envés del filidio. El limbo posee 30 células de anchura, de paredes externas convexas, con margen uniestrato o biestrato, a menudo asimétricamente recurvado.

. Nivel apical: el nervio presenta 3 ó 4 estratos de células parenquimáticas, semejantes a las del limbo. Éste es irregularmente biestrato o triestrato, pudiendo alcanzar cuatro estratos en el margen.

No se han observado papilas ni relieves similares.

La punta pilífera es algo decurrente, lisa o denticulada, compuesta por un máximo de 30 fibras en corte transversal.

Ante la luz polarizada, la máxima actividad es registrada por la base del filidio, el tercio basal del nervio y el pelo.

## ANATOMÍA: DISCUSIÓN

### Gametófito

En el caulidio y en el filidio aparece una cutícula periférica (fig. 2 B). Esta presencia está descrita como común, pero no general en musgos (Héban 1977).

Destaca en el filidio, cuando es biestrato, la disposición enfrentada de las células del limbo en contraste con la tendencia a situarse alternadas en el caulidio.

En la ultraestructura del filidio destaca la importancia del estrato primario de la pared (fig. 2 B), que además forma una corona engrosada en la superficie periférica. En las yemas, presentes en tres especies, tan sólo se observa este estrato de la pared (fig. 10 A), aparte de la envuelta periférica irregular que las rodea.

La organización de las paredes celulares de los distintos tejidos del caulidio es básicamente similar en todas las especies. La epidermis y el parénquima no muestran clara diferenciación en función de la ultraestructura de la pared (fig. 9 A). El estrato secundario tiende en ambos tejidos a formar bandas, especialmente en la parte basal del caulidio, que reflejan tal vez distintos ritmos de síntesis de material de pared. Tan sólo se destaca el menor grosor de este estrato y la constricción del primario hacia el interior del caulidio, procesos ambos que son graduales.



El tamaño, aunque es menor en las células epidérmicas, presenta solapamientos en su variabilidad con el de las células parenquimáticas, lo que impide considerarlo por sí solo como carácter distintivo.

Ambas características, en su conjunto, sí permiten en algunas especies una distinción más o menos clara, con *Gr. hartmanii* como caso más destacado (fig. 3 B), donde los engrosamientos llegan a obliterar por completo el lumen de las células epidérmicas.

Una modificación de la pared celular, no exclusiva del parénquima, pero más frecuente en este tejido, es la aparición de campos de punteaduras primarias (figs. 2 A, 5 A), que permiten considerarlo, al menos en su porción apical, como un parénquima conductor. Aunque su presencia concuerda con la afirmación de Héban (1977) sobre su situación cercana al ápice en caulidios fructificados de musgos en general, lo cierto es que los estudios conocidos hasta ahora se basan en musgos mesofíticos (Finocchio 1967, Caputo & Castaldo 1968, Cortella et al. 1994), e incluso Bewley (1979) recoge la aserción (aunque indica que no está comprobada de manera general) de que en musgos xerofíticos están ausentes incluso los simples plasmodesmos aislados. La abundancia de campos de punteaduras en estas especies xerofíticas contradice esta apreciación.

Para definir el campo de punteaduras primarias se ha tenido en cuenta no sólo la constricción que originan en la pared sino, asimismo, el cambio de estructura que ésta presenta en dicha región. Aunque en los manuales de anatomía no se recoge esta condición como característica especializada, se ha observado generalizada en las especies aquí estudiadas que la presentan, y se ha demostrado, con microscopía electrónica de barrido y de transmisión, para *Hookeria lucens* (Cortella et al. 1994).

La morfología y abundancia de los campos de punteaduras primarias varía de unas especies a otras. Como tendencia general, representan una constricción gradual, más abundante en las paredes transversales del parénquima, por lo que se observan mejor en cortes longitudinales. Frente a esto, destacan *Gr. elatior*, que presenta campos de punteaduras muy numerosos, tanto en paredes transversales como en longitudinales, que producen un estrechamiento de la pared extremadamente brusco; *Gr. funalis* y *Gr. torquata*, por la constricción de la pared muy gradual; y *Gr. retracta*, donde las perforaciones, preferentemente situadas en la pared transversal, no se agrupan en campos de punteaduras, en el sentido indicado.

El posible uso taxonómico que sugieren estas diferencias en la morfología y abundancia de estas estructuras requiere de un estudio más extenso sobre su presencia en otras poblaciones y taxones.

Con relación a los hidroides, en éstos se muestra en los tabiques la desorganización de su pared, que queda reducida a una estructura laxamente fibrilar, sin estratificación diferenciada (figs. 3 A, 7 A). Los trígonos aparecen también degradados en su periferia, y hacia niveles basales pueden degenerar por completo, quedando la traza de hidroides sustituida por células parenquimáticas o por una laguna central. Se subraya la relativa preservación de la pared en el estrato más externo del hidroma. Dado que el parénquima adyacente no muestra los signos de degradación de las células de la traza, que es endógena (Hébant 1967, 1974), es posible que, si su protección se debe a una inhibición de las enzimas hidrolíticas responsables de la degeneración citoplasmática y parietal, los factores responsables puedan difundir asimismo a la pared de los hidroides contiguos. En los trígonos destaca la aparición de áreas con perforaciones en *Gr. torquata*, *Gr. incurva* y *Gr. funalis* (fig. 3 A), que a menudo aparecen más opacos, o bien plegados. Aunque no puede descartarse que sean artefactos causados por la precipitación del tetróxido de osmio, del citrato de plomo o del acetato de uranilo, es extraña su alta regularidad en los hidroides de dichas especies, así como su ausencia en otras áreas de la sección y en otros taxones. Si este carácter se debe a un mayor grado de degeneración de la pared, o bien tiene una base taxonómica (las tres especies están relacionadas según Hagen 1909), es algo que debe ser investigado con mayor profundidad .

Se destaca la baja actividad celular apreciada en los ápices de los caulidios de *Gr. decipiens*, *Gr. elatior*, *Gr. funalis*, *Gr. hartmanii*, *Gr. incurva* y *Gr. retracta*, frente a la organización citoplasmática observada en *Gr. orbicularis*, *Gr. pulvinata*, *Gr. torquata* y *Gr. trichophylla*. Aunque la pérdida de actividad celular es más o menos general en todas hacia partes basales, parecen subsistir células en las especies con mayor organización citoplasmática apical. Las diferencias pueden deberse a un distinto ritmo de maduración de las células recién diferenciadas, aunque debe considerarse la posible incidencia de factores debidos a la fijación o a la conservación de las muestras desde su recolección. Aunque no se ha investigado en profundidad, se apunta una relación entre la actividad celular en el caulidio y la capacidad de producción de ramificaciones basales, aparentemente mayor en las cuatro últimas especies.

Independientemente de la complejidad estructural máxima del caulidio de cada especie, en todas se registra, hacia niveles basales, una reducción del diámetro (por colapso o erosión de capas celulares) y una simplificación anatómica, en la diferenciación de la epidermis o de la traza de hidroides (fig. 3 B). Se observa asimismo una tendencia a la ruptura y degradación de las paredes celulares. Esto puede explicarse si la diferenciación estructural está al servicio de la vitalidad del ápice, donde se encuentra la célula apical trilátera responsable del crecimiento.

En los especímenes observados, esta degradación, e incluso la eventual invasión de microorganismos no parece afectar al ejemplar, aparentemente en buen estado. Se subraya la permanencia de este tejido degenerado en forma de una vaina que circunda el caulidio de *Gr. elatior*, *Gr. funalis*, *Gr. hartmanii*, *Gr. retracta* y *Gr. torquata*. Dado el aspecto gelatinoso que presenta en estado hidratado, puede interpretarse como una estrategia de regulación del agua en las bases, o una fuente de nutrientes por los posibles solutos liberados en el proceso de descomposición.

Se ha observado frecuentemente la presencia de microorganismos unicelulares eucariontes (tipo levaduras) y procariontes (con pared, posiblemente bacterias, y sin ella, tal vez micoplasmas). Se encuentran especialmente en los tejidos periféricos, donde se ven túneles que los comunican con el exterior. La invasión de microorganismos parece relacionada con la actividad celular. No se da, ni siquiera ocasionalmente, en ápices con células activas, ni se encuentra siempre en los tejidos muertos, y cuando aparece no suele ser masiva (aunque en las bases, donde a veces degenera la cutícula, puede ser muy avanzada), lo que sugiere que no son directamente causantes de la muerte celular, sino saprófitos oportunistas.

En cuanto a las diferencias estructurales entre las distintas especies, la mayor variabilidad se encuentra en la distinción más o menos clara de la epidermis y en el desarrollo de la traza vascular.

Se destaca en el siguiente cuadro la correspondencia entre los datos, sobre la anatomía del caulidio, del estudio más exhaustivo realizado en el género *Grimmia* (Kawai 1965), y los aquí obtenidos (excepto en *Gr. retracta*, no estudiada por este autor).

|                         | Distinción de la epidermis |          | Distinción de la traza |       | número de hidroides                    |                                   |
|-------------------------|----------------------------|----------|------------------------|-------|--|-----------------------------------|
|                         | *                          | **       | *                      | **    | *                                      | **                                |
| <i>Gr. decipiens</i>    | clara                      | clara    | clara                  | clara | > 15                                   | 25-30                             |
| <i>Gr. elatior</i>      | clara                      | clara    | no clara               | clara | ?                                      | fértiles: 50<br>estériles: -      |
| <i>Gr. funalis</i>      | clara                      | no clara | clara                  | clara | < 15                                   | fértiles: > 20<br>estériles: 8-15 |
| <i>Gr. hartmanii</i>    | clara                      | clara    | clara                  | -     | < 15                                   | -                                 |
| <i>Gr. incurva</i>      | clara                      | clara    | no clara               | clara | ?                                      | 6-10                              |
| <i>Gr. orbicularis</i>  | clara                      | no clara | clara                  | clara | < 15                                   | > 40                              |
| <i>Gr. pulvinata</i>    | clara                      | no clara | clara                  | clara | < 15                                   | 30                                |
| <i>Gr. torquata</i>     | clara                      | clara    | no clara               | clara | ?                                      | 6-10                              |
| <i>Gr. trichophylla</i> | clara                      | clara    | clara                  | clara | ssp. lisae: < 15<br>var. robusta: > 15 | 20-25                             |

\*: observaciones de Kawai (1965)

\*\*: observaciones del presente trabajo

Se han sombreado las casillas donde no concuerdan los datos obtenidos

Se observa un cierto desacuerdo respecto a ambos caracteres. En cuanto a la epidermis, su diferenciación con respecto al parénquima, no es nunca tajante (salvo para *Gr. hartmanii*), dada la forma y tamaño, tan sólo levemente diferente, de sus células, y la disminución gradual del grosor de las paredes. Estas características, que no consiguen por separado una distinción cualitativa de ambos tejidos, pueden verse sometidas a una variación interpoblacional que explique estas discrepancias.

No ocurre lo mismo, sin embargo, con la traza de hidroides. En *Gr. incurva* y *Gr. torquata*, donde para Kawai (1965) la diferenciación de la traza no es clara, la distinta estructura de sus paredes permite siempre una delimitación nítida (aunque el desarrollo de este tejido sea pobre), incluso frente al parénquima cuyas células aparecen vacías. En *Schistidium apocarpum* este autor recoge observaciones sobre la presencia de hidroma en caulidios fértiles y la ausencia en los estériles. En sus propias investigaciones, incluidas en el citado trabajo, llega a la conclusión de que los estériles poseen una traza de hidroides, aunque oscuramente diferenciados. Esta situación se planteó con *Gr. elatior*, donde siempre se ha apreciado la total ausencia de hidroma en caulidios estériles, y su presencia en los fértiles, sin que se haya observado la existencia de células intermedias que puedan causar una interpretación dudosa.

La resolución del microscopio óptico, con el que trabajó Kawai, impide esta diferenciación, e incluso la determinación exacta del número de hidroides presentes en una sección, carácter en el que también aparecen divergencias (aunque puede estar sometido a mayor variabilidad intraespecífica, y deberse a las distintas poblaciones o subespecies utilizadas).

El caso de *Gr. hartmanii*, en la que Kawai (1965) observa distintamente una traza, no puede ser explicado por las razones anteriores. Un estudio posterior sobre varias poblaciones de *Gr. hartmanii* (Vitikainen 1969), confirma la ausencia total de hidroma, lo que le sirve al autor para apoyar la separación de *Gr. anomala*, con traza presente, como especie independiente. Se desconoce si Kawai empleó en su estudio poblaciones de *Gr. anomala* o *Gr. retracta*, ambas consideradas por muchos autores, incluyendo Wijk et al. (1959-1969) y Crosby et al. (1992), como subespecies de *Gr. hartmanii*.

En cuanto a los datos obtenidos por Deguchi (1978) para *Gr. funalis*, *Gr. incurva* y *Gr. trichophylla*; y Cao & Vitt (1986) para *Gr. pulvinata*, *Gr. decipiens*, *Gr. incurva* y *Gr. elatior*, en ambos casos consistentes en un dibujo de una sección transversal con un comentario referido exclusivamente al grado de desarrollo de la traza, están fundamentalmente de acuerdo con las observaciones aquí registradas.

Con respecto a estas observaciones, es preciso tener en cuenta que, en dos especies, los ejemplares estériles presentan una traza menos desarrollada que los fértiles (*Gr. funalis*) o ausente por completo (*Gr. elatior*, fig. 1 B). Por tanto, los hidromas relativamente pobres de *Gr. incurva* (fig. 5 B) y *Gr. torquata* (fig. 9 B) pueden deberse a la esterilidad de los caulidios en que aparecen.

Con las salvedades expuestas en cuanto a la diferenciación de epidermis, pueden distinguirse los siguientes tipos de caulidios. Los números romanos corresponden al número de tejidos presentes, según una tipificación posterior de Kawai (1989).

A. Diferenciación relativamente clara de los tres tejidos (III), traza desarrollada:

*Gr. decipiens* (diámetro relativamente grande)

*Gr. retracta* (diámetro relativamente grande)

*Gr. trichophylla* (diámetro mediano)

*Gr. elatior* (caulidios fértiles, diámetro mediano)

B. Diferenciación relativamente clara de la epidermis, traza reducida:

*Gr. incurva* (diámetro mediano): III

*Gr. hartmanii* (diámetro relativamente grande, sin traza): II

*Gr. torquata* (diámetro relativamente pequeño): III

*Gr. elatior* (caulidios estériles, diámetro mediano): II

C. Diferenciación escasa de la epidermis, traza desarrollada (III?):

*Gr. orbicularis* (diámetro mediano)

*Gr. pulvinata* (diámetro mediano)

D. Diferenciación escasa de la epidermis, traza reducida (III?):

*Gr. funalis* (diámetro relativamente pequeño)

En general, el diámetro se relaciona con la robustez del aspecto de la planta, salvo en *Gr. elatior*, donde este aspecto se debe a la densa imbricación de filidios.

La complejidad estructural permite agrupar especies consideradas próximas, como *Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*, o *Gr. incurva* y *Gr. torquata* (Hagen 1909). Algunos autores la consideran como una medida del grado de evolución o primitivismo del vegetal, pero su valor sistemático es dudoso por la posible variabilidad intraespecífica, tal vez inducida por las condiciones ambientales.



Las reacciones histoquímicas en el caulidio demuestran la abundancia de sustancias pécticas (fig. 4 A) y, en la periferia, de fenoles. De forma general, las paredes enrojecen en medios alcalinos (figs. 3 C, 10 B), lo que sugiere la presencia de compuestos ácidos. El test para la presencia de celulosa permite una diferenciación de los dos estratos de la pared, al menos en los estratos externos. Se demuestra que los lípidos constituyen las principales sustancias ergásticas (fig. 11B), y, aunque el azul de Nilo muestra variabilidad en cuanto a la proporción de lípidos ácidos y neutros, parece deberse, al menos en parte, a la fenología de la planta, al dar resultado distinto en caulidios desarrollados y en inicios de ramificaciones.

En cuanto al filidio, en el siguiente cuadro se reúnen las principales características observadas por Kawai (1965) en relación con las aquí registradas (excepto en *Gr. retracta*, no estudiada por este autor).

|                         | n° de células adaxiales           |            | diferenciación de tejidos del nervio |       | biestratificación         |                                | punta pilífera       |           |
|-------------------------|-----------------------------------|------------|--------------------------------------|-------|---------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------|
|                         | *                                 | **         | *                                    | **    | *                         | **                             | *                    | **        |
| <i>Gr. decipiens</i>    | 6-7                               | 4          | clara                                | clara | limbo                     | irregular, limbo y margen      | dentada              | dentada   |
| <i>Gr. elatior</i>      | 2                                 | 2 +<br>4-6 | media                                | media | limbo y margen, irregular | irregular, limbo y margen      | sin punta            | dentada   |
| <i>Gr. funalis</i>      | 2<br>(var. <i>calvescens</i> : 5) | 2          | no clara a media                     | media | limbo y margen            | limbo y margen                 | dentada, o sin punta | dentada   |
| <i>Gr. hartmanii</i>    | 4                                 | 6          | media                                | clara | margen                    | margen                         | sin punta            | dentada   |
| <i>Gr. incurva</i>      | 2                                 | 2          | no clara                             | clara | margen                    | limbo y margen                 | sin punta            | corta     |
| <i>Gr. orbicularis</i>  | var. <i>persica</i> : 2           | 2          | media                                | media | no                        | extremo apical, limbo y margen | lisa                 | lisa      |
| <i>Gr. pulvinata</i>    | 2                                 | 2          | media                                | media | margen                    | margen                         | lisa                 | lisa      |
| <i>Gr. torquata</i>     | 2                                 | 2          | no clara                             | media | no                        | no                             | sin punta            | muy corta |
| <i>Gr. trichophylla</i> | 2<br>(var. <i>robusta</i> : 6)    | 2          | media<br>(clara)                     | clara | margen                    | limbo y margen                 | lisa<br>(sin punta)  | lisa      |

\*: observaciones de Kawai (1965)

\*\*: observaciones del presente trabajo

Se han sombreado las casillas donde no concuerdan los datos obtenidos.

Se observan abundantes discordancias en cuanto a la presencia de una punta pilífera, la tendencia a la biestratificación del limbo, y a la distinción de los estratos.

La primera característica, según los autores de las diversas descripciones aquí recogidas es relativamente variable. Las especies que Kawai describe como carentes de pelo se han observado en esta tesis con una punta, aunque muy corta. De esto no puede derivarse una gran discrepancia.

La tendencia a la biestratificación del limbo observada es muy a menudo irregular, por lo que no cabe esperar una gran constancia taxonómica.

La distinción de los tejidos, en tanto que Kawai no define los tipos celulares que encuentra, es meramente subjetiva. La aquí presentada es asimismo una valoración personal sobre el grado de diferenciación, que no necesariamente sigue el criterio de Kawai.

En cuanto al número de células adaxiales en el nervio, el desacuerdo es relativamente pequeño, teniendo en cuenta la fundamental coincidencia en si es dos o superior a dos. En el caso de *Gr. hartmanii*, además, como se ha expuesto para el caulidio, Kawai podría haber estudiado otra especie. En el de *Gr. elatior*, aquí se han añadido las células no estrictamente adaxiales, pero sí diferenciadas igual que éstas. Este carácter, por tanto, presenta relativa estabilidad, y como considera Kawai (1965), puede ser importante taxonómicamente.

En función de la variabilidad de los caracteres del filidio estudiados, las especies pueden dividirse en los siguientes grupos (se reseñan los otros tipos celulares presentes en el nervio, así como los relieves de las células y la tendencia a la biestratificación del limbo):

- dos capas de células-guía adaxiales en el nervio: (estereidas; alta papilosidad; bi- o triestratificación apical).

*Gr. elatior*

- una capa de células-guía adaxiales en el nervio:

. más de dos células-guía (estereidas; sin relieves; tendencia a limbo uniestrato):

*Gr. decipiens*

*Gr. hartmanii*

*Gr. retracta*

. dos células-guía:

(estereidas)

*Gr. torquata* (prórulas; limbo uniestrato)

*Gr. incurva* (sin relieves; biestratificación irregular)

(estereidas y células leptodermas)

*Gr. orbicularis* (prórulas; biestratificación apical)

*Gr. pulvinata* (sin relieves; biestratificación marginal)

*Gr. trichophylla* (sin relieves; biestratificación irregular)

*Gr. funalis* (sin relieves; biestratificación irregular)

La arquitectura del filidio, ante la luz polarizada, revela principalmente refuerzos en la base del nervio y en la punta pilífera (ocasionalmente en la inserción del filidio). Con menos intensidad aparece en el resto del nervio y en el margen.

El pelo, de naturaleza fundamentalmente celulósica, tiene un significado primordialmente ecológico, como Kawai (1965) demostró en esta familia estudiando poblaciones de *Schistidium apocarpum*, procedentes de distintos ambientes hídricos.

Las reacciones histoquímicas dan clara presencia de pectinas (excepto en *Gr. funalis*), diferenciación de los dos estratos de la pared en cuanto a la detección de celulosa, una fuerte presencia de sustancias fenólicas (fig. 8 B) y una reacción en medios alcalinos diferente a la de los caulidios. La detección de almidón produce un oscurecimiento indefinido de la mitad apical del filidio (en correspondencia con su mayor riqueza en cloroplastos y tendencia a la biestratificación) y del nervio (lo que refleja probablemente su función conductora de polisacáridos solubles).

## ANATOMÍA: RESULTADOS

### Esporófito

#### SETA

Se estudia como tal en la presente investigación la región del esporófito, de diámetro constante en toda su longitud para un mismo individuo, comprendida entre el nivel en que, aún envainada por la vagínula, desaparecen las células de transferencia en su periferia, y el nivel, cercano a la cápsula, en que su sección transversal comienza a ensancharse.

Una característica de las especies pertenecientes a *Trichophyllae* es que su seta presenta siempre un cierto grado de curvatura (variable según las especies) en estado hidratado, aunque aparece erguida y sinistrorsa cuando seca.

La seta está formada por una serie de capas concéntricas de células en las que el grosor de las paredes tangenciales decrece de la periferia al centro, dispuestas de manera que no quedan entre ellas espacios intercelulares. Las paredes de estas células, al igual que las gametofíticas, están formadas por:

- . Una pared primaria, relativamente delgada, que forma trígonos (ocasionalmente tetrágonos) en los ángulos de confluencia de las células, y que se sitúa simétricamente a ambos lados de la lámina media en las regiones que unen los trígonos.

- . Una pared secundaria, a su vez estratificada o no, con espesor y aspecto variable, del que depende la diversidad de grosores de las distintas células.

En función de la especialización de sus células y de su ubicación se diferencian los tejidos que se indican a continuación. Aunque posteriormente se discutirá la naturaleza de los mismos, se ha utilizado en su denominación la terminología empleada por Héban (1977).

. epidermis, constituida por una o varias capas, caracterizada por la tendencia a la regularidad de sus células en tamaño y forma, por el alto grado de engrosamiento de sus paredes celulares en relación al lumen, por el alargamiento en dirección tangencial que éste muestra y, especialmente, por la fuerte asimetría de sus paredes celulares tangenciales: la externa es mucho más engrosada, y se curva en forma de media luna. La capa periférica presenta una fina cutícula (en general, del orden de 0,05  $\mu\text{m}$  de espesor), muy transparente a los electrones.

. parénquima, formado por células con paredes más finas, donde las tangenciales presentan una asimetría poco marcada, que además se va perdiendo hacia el interior de la seta, con lumen de sección transversal isodiamétrica, mucho mayor en relación al espesor parietal, y de forma y tamaño irregulares.

. traza central de hidroides, constituida por células muertas, normalmente vacías, con paredes celulares degeneradas en grado diverso, aunque los trígonos de pared primaria suelen aparecer íntegros.

Se han observado muy escasas comunicaciones plasmodésmicas entre las células de la seta. En las paredes tangenciales y radiales, muy raramente, han aparecido algunas de manera aislada. Los tabiques transversales de la epidermis y parénquima (que son perpendiculares al eje longitudinal de la seta o sólo ligeramente oblicuos, y nunca se muestran particularmente engrosados), presentan frecuentemente plasmodesmos, en número bastante escaso, que nunca se agrupan en campos de punteaduras ni su localización es en zonas de la pared adelgazadas o que muestren diferencias estructurales con respecto a las regiones carentes de estas comunicaciones.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, las siguientes se han desarrollado de manera similar en todas las especies:

- La reacción para el almidón da un resultado positivo tan sólo en setas de esporófitos muy inmaduros (fig. 13 B), donde lo detecta preferentemente en el parénquima interno, en forma de pequeños corpúsculos, posiblemente correspondientes a cloroplastos, o bien como una sustancia informe, que tal vez indique la presencia de polisacáridos solubles.

- Los colorantes Sudán III y Sudán Black se fijan en una fina película periférica, que podría corresponder a la cutícula observada al microscopio electrónico de transmisión, compuesta probablemente por lípidos saturados, dado que no se tiñe con tetróxido de osmio. También han mostrado la presencia de abundantes lípidos citoplásmicos, especialmente en las capas celulares externas.

- El azul de Nilo, que reacciona de forma variable con los lípidos citoplásmicos, sin embargo, de modo similar en todas las especies, tiñe intensamente las paredes celulares de la seta.

- En todos los casos las detecciones de ligninas y suberina han sido fallidas.



- Aunque la reacción para detectar celulosa, descrita como inmediata por Jensen (1962), necesita varias horas para tener lugar (al igual que lo observado en las estructuras gametofíticas, con excepción del pelo del filidio), el resultado es positivo para toda la pared, con excepción de una banda periférica más ancha que lo que podría corresponder a la cutícula y de los trígonos epidérmicos y parenquimáticos.

- Las soluciones básicas cambian la coloración de las paredes (figs. 18 B, 20 B, 22 B), inicialmente verdosas y translúcidas, a un amarillo vivo, en ocasiones con un tono anaranjado, mientras que las ácidas producen un amarillo débil, en concordancia con los efectos producidos en filidios.

## CÁPSULA

Como se indica en sus correspondientes descripciones, la cápsula de estas especies se inserta erecta o levemente inclinada con respecto a la seta. Por la curvatura de ésta, es frecuente que, en estado hidratado, se encuentre inmersa entre los filidios superiores del pulvínulo, aunque la torsión de la seta determina su posición erguida cuando seca. Su forma varía entre subglobosa-oval (*Gr. funalis* y *Gr. orbicularis*), y elipsoidal-obloide (*Gr. decipiens*, *Gr. elatior*, *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla*). Más notoriamente en las especies citadas en segundo lugar, su pared está recorrida en toda su longitud por 8-12 costillas (8 es el número más común que presentan las cápsulas), que se remarcan especialmente en condiciones de deshidratación (fig. 12 B).

Su base, en continuidad con el extremo apical de la seta, queda delimitada por el nivel en que aumenta bruscamente el diámetro de la sección transversal del esporófito (fig. 12 C).

Su anatomía es muy homogénea en todas las especies estudiadas. La variabilidad debida a características morfológicas externas (color, forma, tamaño, longitud e inclinación del rostro del opérculo) ya ha sido considerada por los diversos autores de las descripciones.

En el extremo proximal de la urna, y con respecto a los tejidos presentes en la seta, se producen las siguientes modificaciones:

- La epidermis se hace progresivamente uniestrata. Los engrosamientos de pared secundaria quedan limitados a la cara tangencial externa que constituye la periferia, que pierde además su forma arqueada, pasando a ser recta. Las dimensiones del lumen no se alteran sustancialmente.

- Las células parenquimáticas tienden a redondearse y hacerse isodiamétricas (20-30  $\mu\text{m}$ ), homogéneamente leptodermas. En el estado de desarrollo analizado muestran una gran cantidad de cloroplastos (fig. 13 A).

- La traza de hidroides desaparece y es sustituida por células de citoplasma denso y paredes muy delgadas, en sección transversal semejantes en diámetro a las parenquimáticas (fig. 14 A) y que, con respecto al eje longitudinal de la cápsula, se acortan (10-15  $\mu\text{m}$ ) y se disponen opuestas entre sí.

A lo largo de toda la cápsula, la epidermis no presenta más variación que la debida a una fila irregular de estomas ciclocíticos y faneróporos en el cuello (muy frecuentemente, en la base de cada costilla, figs. 12 A, B, C); a la existencia de tres o cuatro estratos de células muertas, de sección transversal oblonga, paquidermas, que constituyen el anillo de apertura; y de un cierto ensanchamiento radial de sus células hacia el ápice, especialmente notable en las costillas.

Por el contrario, el parénquima, que en el cuello forma un tejido clorofílico laxo, con abundantes espacios intercelulares (e incluso, bajo los estomas, pequeñas cámaras irregulares, fig. 13 A), en niveles superiores da lugar a un tejido de 2 (3) estratos de células muy vacuolizadas, no clorofílicas, adyacente a la epidermis, que forman la pared de la urna, en tanto que las células clorofílicas quedan relegadas a la envuelta externa del cilindro central, a la capa más interna de la pared, y a 16 columnas de células (fig. 14 C) que recorren longitudinalmente ésta hasta terminar en la base de cada diente del perístoma. A intervalos irregulares aparecen trabéculas que unen el tejido clorofílico del cilindro con las columnas parietales, demostrando su continuidad.

Las células que sustituyen a la traza de hidroides se continúan, a través de un pedículo (donde mantienen su forma y dimensiones), con la columela, de células isodiamétricas de gran tamaño (50-100  $\mu\text{m}$ ), muy vacuolizadas, con escasos cloroplastos (fig. 14 C). En el extremo apical este tejido es continuo con el que rellena el opérculo (de células algo menores, de aproximadamente 30-50  $\mu\text{m}$ ), y contacta con las paredes de éste a través de dos estratos de células que dan origen al perístoma.

El tejido esporógeno aparece rodeando lateralmente la columela, sin sobremontarla por arriba o por abajo, con esporosaco externo e interno, constituido por un solo estrato de células en cada lado, que presentan una sección transversal rectangular (10-15  $\times$  20-25  $\mu\text{m}$ ), alargadas en sentido tangencial, y con un citoplasma denso (fig. 14 C).

En la madurez se degrada el tejido clorofílico, y la superficie de las células del tapete en contacto con el tejido esporógeno aparece cubierta de un material amorfo, semejante al que compone la perina de las esporas. La liberación de éstas presiona la capa externa del tapete contra las paredes de la urna, produciendo la falsa apariencia de su ubicación parietal (fig. 14 B).

El perístoma de estas especies es, como describe Edwards (1979), haplolépido (fórmula peristomática 2:3, es decir, dos células del estrato peristomático primario y tres del peristomático interno en un octavo de arco de circunferencia de la urna), posee 16 dientes (como se recoge asimismo en las diversas descripciones) y no se ha observado la presencia de una membrana basal. En todos los casos presenta resaltes dorsales más o menos acusados, que proceden de las paredes transversales de las células de la capa peristomática primaria, y una línea media ventral zigzagueante poco destacada, que corresponde a las paredes longitudinales. En cambio, la ornamentación, el tamaño, la forma y el grado de división de sus dientes es variable en estas especies, por lo que estos caracteres son los únicos de la cápsula que se reseñan individualmente para cada una.

---

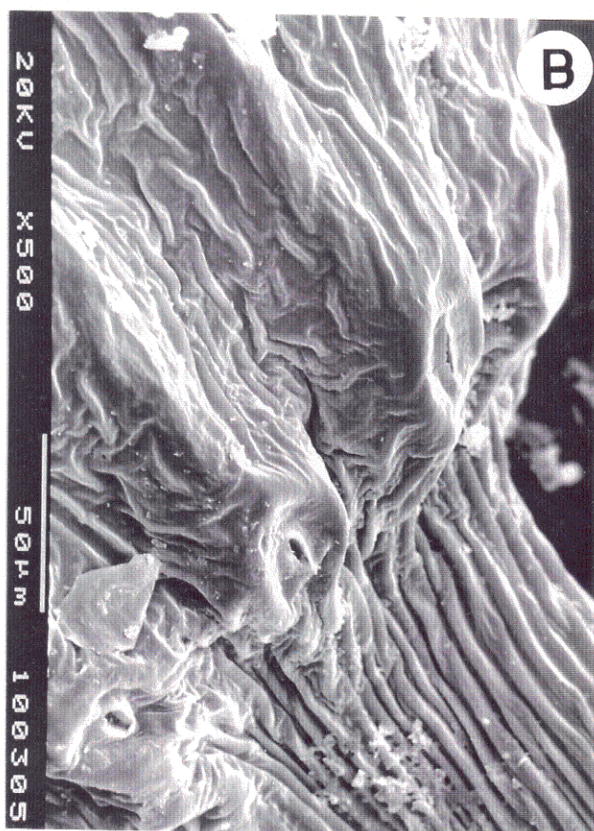
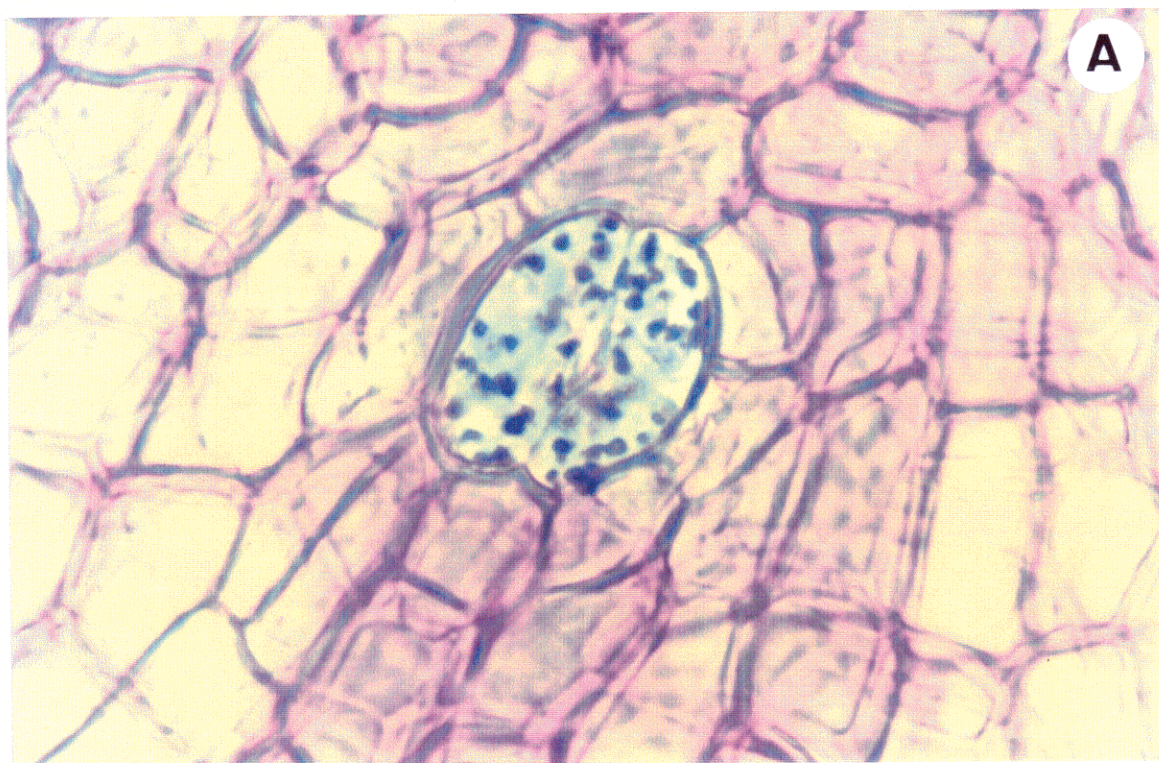
**Fig. 12.** A: Estomas de cápsula de *Gr. pulvinata*. Test de detección de almidón (Lugol), 850×. B: Cuello de cápsula de *Gr. pulvinata*, a MEB. C: Cuello de cápsula de *Gr. pulvinata*. Test de detección de almidón (Lugol), 220×.

**Fig. 13.** A: Corte transversal de estoma de cápsula de *Gr. pulvinata*, sin teñir, 850×. B: Ápice de seta; cuello y tejido esporógeno de cápsula de *Gr. pulvinata*, test de detección de polisacáridos solubles (Lugol), 220×.

**Fig. 14.** A: Corte transversal de región de transición entre seta y cápsula de *Gr. pulvinata*, teñida con azul de metileno, 1500×. B: Corte transversal de cápsula madura de *Gr. trichophylla*, teñida con azul de metileno, 1500×. C: Corte transversal región media de cápsula de *Gr. pulvinata*, 150×.

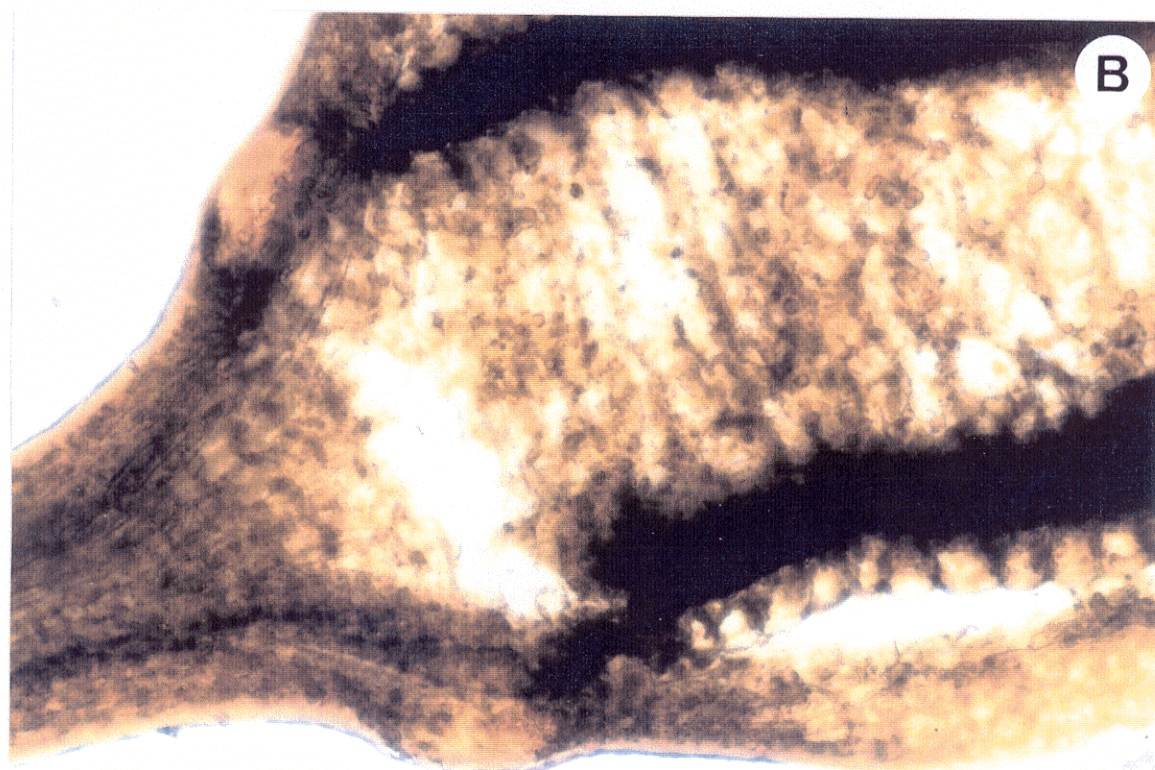
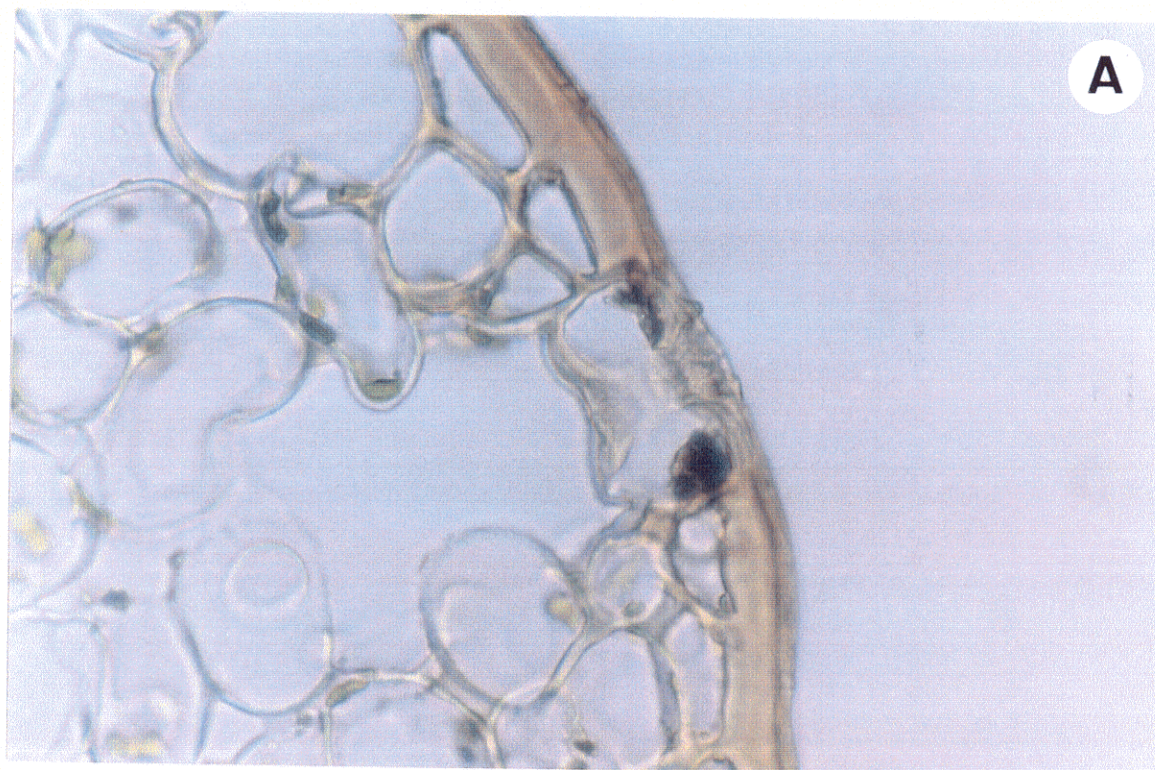
---





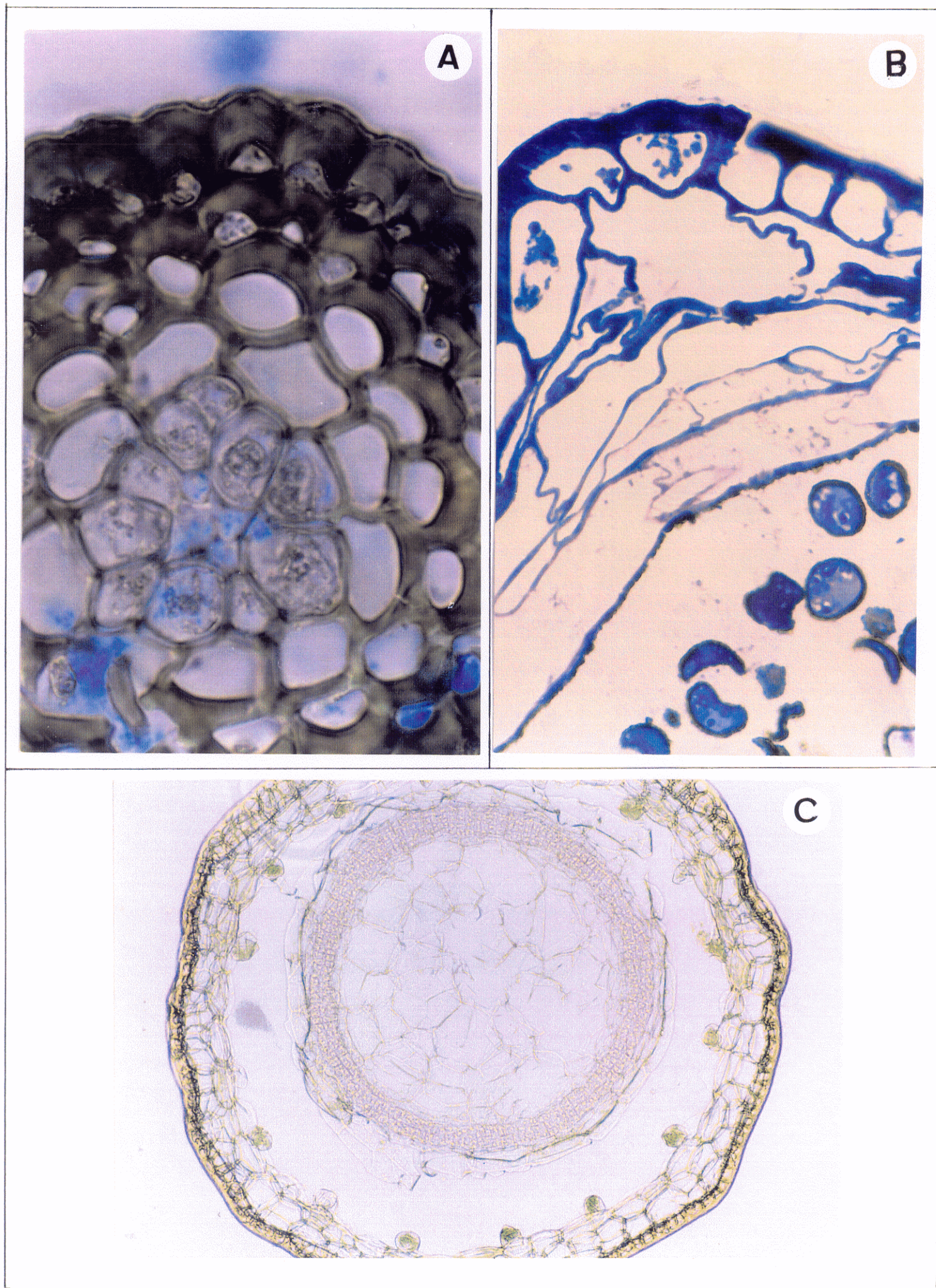
















En cuanto a las reacciones histoquímicas, se detecta almidón, aparentemente localizado en los cloroplastos, particularmente en el cuello de la urna (fig. 13 B), si bien en esporófitos muy inmaduros se encuentra abundantemente en toda la cápsula. En las células de guarda estomáticas aparecen acúmulos amilíferos especialmente densos (figs. 12 A, C). El tejido esporógeno da asimismo una fuerte reacción, produciendo una banda oscura que se prolonga hacia las células adyacentes a la columela y hacia el parénquima interno de la seta (fig. 13 B). A gran aumento, la detección en el tejido esporógeno no aparece localizada en cloroplastos, sino en los espacios intercelulares, y la coloración mostrada parece corresponder a polisacáridos de cadena más corta. Al alcanzar la madurez, deja de detectarse almidón en las células de la cápsula.

No se han localizado acúmulos lipídicos.

Las reacciones de pared muestran un comportamiento semejante al encontrado en la seta, aunque la detección de celulosas y pectinas se produce con mayor intensidad, y, de forma ocasional, la coloración manifestada en soluciones alcalinas da tonalidades más rojizas, similares a las gametofíticas, especialmente en cápsulas maduras.

*Gr. decipiens*

*SETA*

Diámetro de 130-150  $\mu\text{m}$ .

La epidermis está formada por células bastante regulares (fig. 15 A, B), de 50-70  $\mu\text{m}$  en su eje longitudinal, 10-12  $\mu\text{m}$  de dimensión radial y 12-15  $\mu\text{m}$  de dimensión tangencial (lumen de  $4-5 \times 6-8 \mu\text{m}$ ). En la base de la seta consta de un solo estrato típico, en la parte media se configura un segundo (fig. 15 B), y en niveles superiores comienza a desarrollarse, de manera irregular a lo largo del contorno de la seta, un tercero. Los estratos bien definidos como epidermis tienden a disponer sus células opuestas a las del adyacente hacia la periferia (fig. 15 B), con lo que en la confluencia las paredes tienden a formar tetraedros, o bien triángulos casi anexionados entre sí, en vez de triángulos aislados, como es habitual en los restantes tejidos, donde las células son alternas.

El parénquima consta de 2-3 (4) estratos de células, también bastante regulares, de 50-70  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, y aproximadamente isodiamétricas (15-20  $\mu\text{m}$ ) en sección transversal. En general, las células periféricas muestran los mínimos valores (fig. 15 B).

Los hidroides forman una traza con sección transversal de contorno irregular (15 B), de 10-15 células más o menos isodiamétricas (5  $\mu\text{m}$ ). El número de hidroides se mantiene aproximadamente constante a lo largo de la seta, salvo cerca del extremo superior de la misma, donde se reducen a 3-4 ó desaparecen.

La pared primaria de las células epidérmicas y parenquimáticas es muy opaca a los electrones, con una banda que la delimita, no siempre perceptible, algo más clara, de estructura fibrilar muy densa, con orientación paralela al contorno del lumen celular. En los trigonos la estructura resulta indistinguible. En los lados su grosor varía entre 0,1-0,3  $\mu\text{m}$ , excepto en los que constituyen la periferia de la seta, donde se engruesa hasta 1  $\mu\text{m}$  (fig. 15 A).

La pared secundaria es de similar densidad electrónica. Con respecto al grosor, en las células epidérmicas manifiesta una fuerte asimetría, pues en las paredes tangenciales externas alcanza 5  $\mu\text{m}$ , y en las internas, sólo 0,3  $\mu\text{m}$ . Hacia el interior, el grosor en ambos lados se va uniformando progresivamente, quedando en 0,5  $\mu\text{m}$  en el parénquima interno. Está subdividida en dos estratos. El externo, algo más transparente a los electrones que la pared primaria, posee una textura de fibrillas paralelas al contorno del lumen, más laxas, y es el principal responsable de las variaciones en grosor de la pared secundaria. El interno es muy electrondenso, granular, de 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  de grosor. En las paredes tangenciales externas de las células periféricas es frecuente la aparición de un tercer estrato, de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de grosor, igualmente muy electrondenso, de aspecto laxamente reticular (fig. 15 A).

En función de la forma y de las paredes celulares, se observa una transición gradual entre la epidermis y el parénquima en el nivel basal y medio de la seta, dado que la capa adyacente a la epidermis tiene características intermedias (paredes tangenciales algo asimétricas, la externa más engrosada y arqueada, pero con tendencia a ser isodiamétricas y de tamaño irregular en su sección transversal). Hacia niveles superiores va perdiendo características parenquimáticas y constituyéndose en segundo estrato epidérmico, y se encuentran secciones donde algunas zonas presentan dos y otras en que sólo puede considerarse uno como tal. Cuando esta transformación se ha completado, la transición entre epidermis y parénquima es claramente delimitable.

La pared de los hidroides es siempre continua, pero se observa degenerada. En los trígonos la pared primaria aparece íntegra, biestrata, semejante a la de los otros tejidos, mientras que la pared secundaria, siempre adyacente, se muestra laxamente fibrilar, poco electrondensa. En los lados, la pared presenta un grosor total de 0,15-0,2  $\mu\text{m}$ , y en apariencia está constituida por pared secundaria semejante a la que bordea los trígonos. De forma discontinua se observan restos de lámina media y de pared primaria.

La delimitación entre hidroides y parénquima es siempre clara y, en su zona de contacto, sólo la pared correspondiente a aquéllos muestra degeneración.

En su conjunto, la pared da una fuerte reacción positiva para las pruebas de detección de pectinas y sustancias fenólicas (fig. 15 B). Éstas se localizan preferentemente en una banda periférica externa y en los trígonos parenquimáticos. Sin embargo, la prueba para la celulosa, aunque se ajusta a las características generales, da una reacción relativamente débil, especialmente en la epidermis.

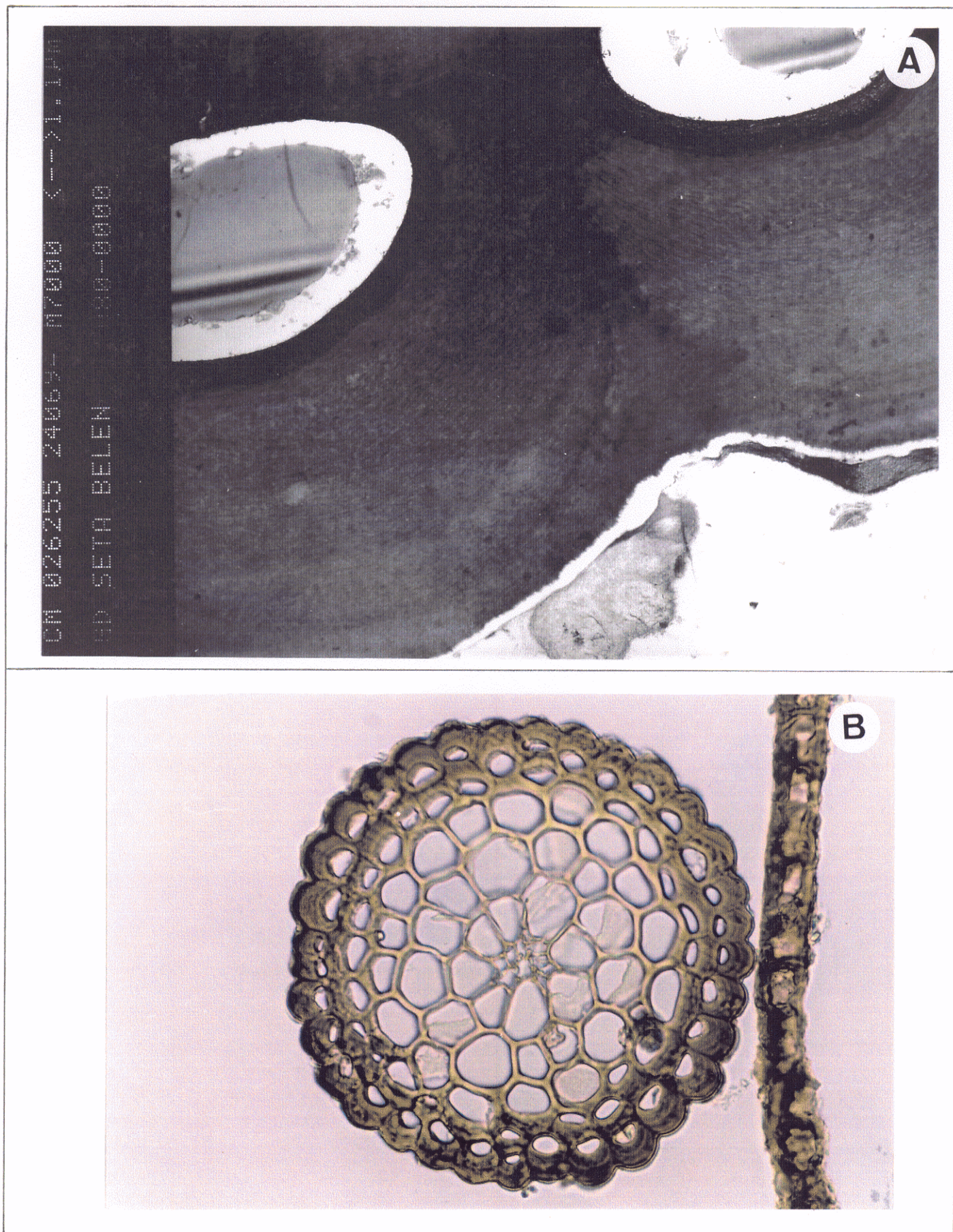
---

**Fig. 15.** A: Corte transversal de seta de *Gr. decipiens*, epidermis, a MET. B: Corte transversal de seta (nivel medio) de *Gr. decipiens*. Test de detección de sustancias fenólicas ( $\text{FeCl}_3$ ), 600 $\times$ .

**Fig. 16.** A: Perístoma de *Gr. decipiens*, cara externa, a MEB. B: Perístoma de *Gr. decipiens*, cara interna, a MEB. C: Perístoma de *Gr. elatior*, cara externa, a MEB. D: Perístoma de *Gr. elatior*, cara interna, a MEB.

---

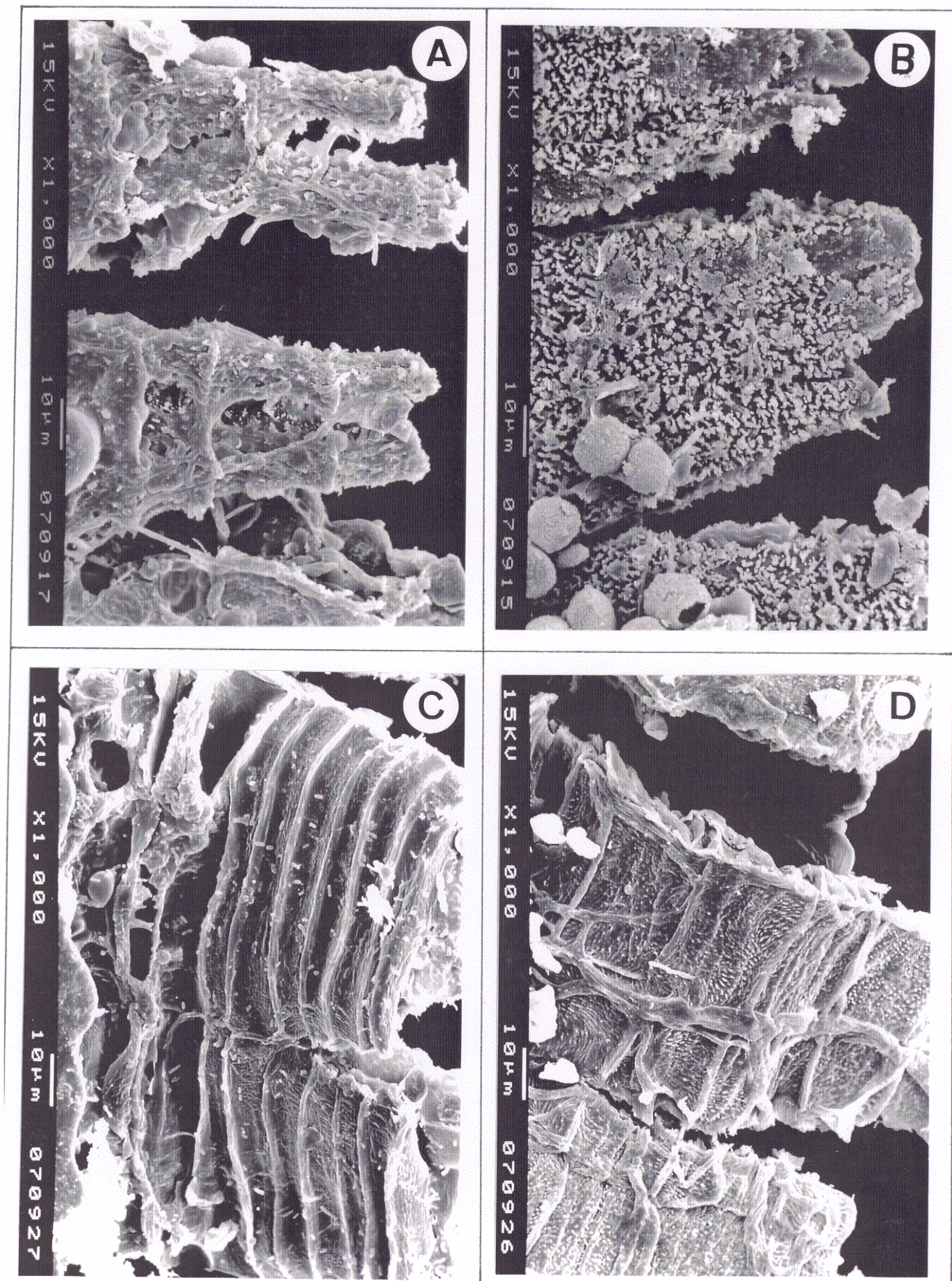
















Por su parte, el citoplasma en los tejidos epidérmico y parenquimático presenta clara degeneración, excepto, ocasionalmente, en las células epidérmicas, donde se han observado mitocondrias y cloroplastos bien organizados. En las restantes células se encuentran exclusivamente restos de membranas y abundantes acúmulos lipídicos. Se han observado restos electrondensos, amorfos, en el interior de algunos hidroides. No se ha observado la presencia de microorganismos ni señales de degradación de pared debida a su actividad en ninguna sección de la seta.

La coloración rosada de las gotas lipídicas tras la aplicación de azul de Nilo muestra un predominio de lípidos neutros.

#### *PERÍSTOMA*

Dientes lanceolados, rectos, divididos irregularmente en dos o tres segmentos longitudinales desde su mitad por fenestras o, en su tercio apical, por aberturas continuas (fig. 16 A).

La cara externa tiene resaltes relativamente poco marcados, y está ornamentada por estrías verticales, posiblemente originadas por la anastomosis de las bases de papilas que se observan aisladamente en el extremo distal. En el proximal la ornamentación es sensiblemente menos notoria (fig. 16 A).

La cara interna es muy densamente papilosa, con relieves ramificados, ocasionalmente erosionados en la base del diente. No se perciben apenas los contornos de las paredes de la capa peristomática interna (fig. 16 B).

***Gr. elatior***

*SETA*

Diámetro de 150-175  $\mu\text{m}$ .

La epidermis consta de células que miden 18-20  $\mu\text{m}$  en su dimensión radial y 10-12  $\mu\text{m}$  en la tangencial (lumen de  $4.5 \times 8.10$ , respectivamente). Está formada por un estrato de células bien diferenciadas, aunque desde el nivel basal, de modo irregular a lo largo del contorno de la cápsula, se observa un segundo (fig. 17 B). Hacia niveles superiores este estrato aparece con mayor regularidad (casi nunca llega a circundar por completo la seta), y sólo ocasionalmente se forma un tercero en algunas regiones aisladas. La tendencia de las células de estratos adyacentes a oponerse entre sí es asimismo irregular (fig. 17 B), más acusada en la parte alta de la seta.

El parénquima está formado por 3 (-4) estratos celulares, con células aproximadamente isodiamétricas (aunque las más internas tienden a alargarse radialmente), de 15-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, con máximos valores en la capa contigua a la más interna (fig. 17 B).

La traza central, de sección aproximadamente circular, está constituida por 10-12 hidroides en la base de la seta, de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro (fig. 17 B). Este número decrece paulatinamente hacia el extremo superior, hasta desaparecer por completo.

En cuanto a las paredes celulares epidérmicas y parenquimáticas, se observa un estrato primario de 0,1-0,3  $\mu\text{m}$  de grosor en los lados de la pared, salvo los que constituyen el perímetro de la seta, donde forma una corona que alcanza 0,8  $\mu\text{m}$ . Es medianamente denso a los electrones, con excepción de una banda más transparente (fig. 17 A), no siempre perceptible. Su aspecto es densamente fibrilar, con orientación paralela al contorno del lumen celular (en el interior de los trígonos, sin embargo, es de estructura en apariencia amorfa).

La pared secundaria presenta en las células periféricas grandes diferencias de grosor entre la cara tangencial externa y la interna (5  $\mu\text{m}$  frente a 0,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente), que disminuyen progresivamente hacia el interior (0,6  $\mu\text{m}$  frente a 0,5  $\mu\text{m}$ ). En el estrato celular más interno, la pared se adelgaza más bruscamente, y se iguala el grosor en ambas caras (0,3  $\mu\text{m}$ ). La pared secundaria es de densidad electrónica semejante a la primaria, de estructura reticular relativamente laxa, con gránulos más opacos formando bandas concéntricas al lumen celular, con separación variable entre sí, en número desde 5-6 en la epidermis a 1-2 en el parénquima interno. Ocasionalmente pueden aparecer dos estratos adicionales hacia el interior, muy electrondensos, con apariencia reticular muy laxa el más interno, y granular el contiguo.

Según la forma de las células y las características de sus paredes, se observa una transición gradual entre epidermis y parénquima. Sólo en niveles cercanos a la cápsula la delimitación entre ambos tejidos es más clara.

La pared de los hidroides se muestra degenerada. El estrato primario se observa íntegro en los trígonos, que están bordeados por una pared secundaria muy laxa, poco densa a los electrones con excepción de una fina banda interna. Los lados, de 0,2  $\mu\text{m}$  de grosor, aparecen continuos, formados en apariencia sólo por la pared secundaria, con trazos interrumpidos de la lámina media (fig. 17 A).

En el límite entre hidroides y parénquima, tan sólo la pared correspondiente a aquéllos aparece degradada (fig. 17 A).

En su conjunto, las pruebas histoquímicas realizadas sobre paredes celulares dan una reacción débil en cuanto a la detección de celulosa, mediana para pectinas y fuerte, especialmente en las paredes epidérmicas, para sustancias fenólicas.

En cuanto al interior celular, se observa un alto grado de degeneración citoplásmica. Se conservan algunos cloroplastos en las células periféricas, así como abundantes acúmulos lipídicos, preferentemente en epidermis e hidroides. La prueba del azul de Nilo muestra un predominio de lípidos ácidos y de mezclas de ácidos y neutros. Con microscopía electrónica de transmisión, en el lumen y en las paredes de las células del interior de la seta se ha observado un gran número de microorganismos (fig. 30 B), de organización eucariota (probablemente levaduras), que esporádicamente aparecen también en los tejidos periféricos, y que no se corresponden con la epiflora, formada principalmente por procariontes. El espécimen estudiado mostraba una organización normal de la cápsula y del gametófito subyacente.

#### PERÍSTOMA

Dientes linear-lanceolados, algo flexuosos en el extremo distal. No se han observado perforaciones ni divisiones longitudinales.

La cara externa presenta pronunciados resaltes. Su superficie está ornamentada por estrías verticales, sinuosas, probablemente originadas por anastomosis de bases de papilas, que son sólo visibles aisladamente en el extremo apical (16 C).

En la cara interna se remarcán acusadamente los contornos de las células de la capa peristomática interna, junto con rugosidades de semejante relieve, que recorren irregularmente la superficie del diente, que a su vez está laxamente tapizada por estrías verticales, sinuosas, y por papilas, normalmente sin ramificaciones, que tienden a ralear en el extremo proximal (16 D).

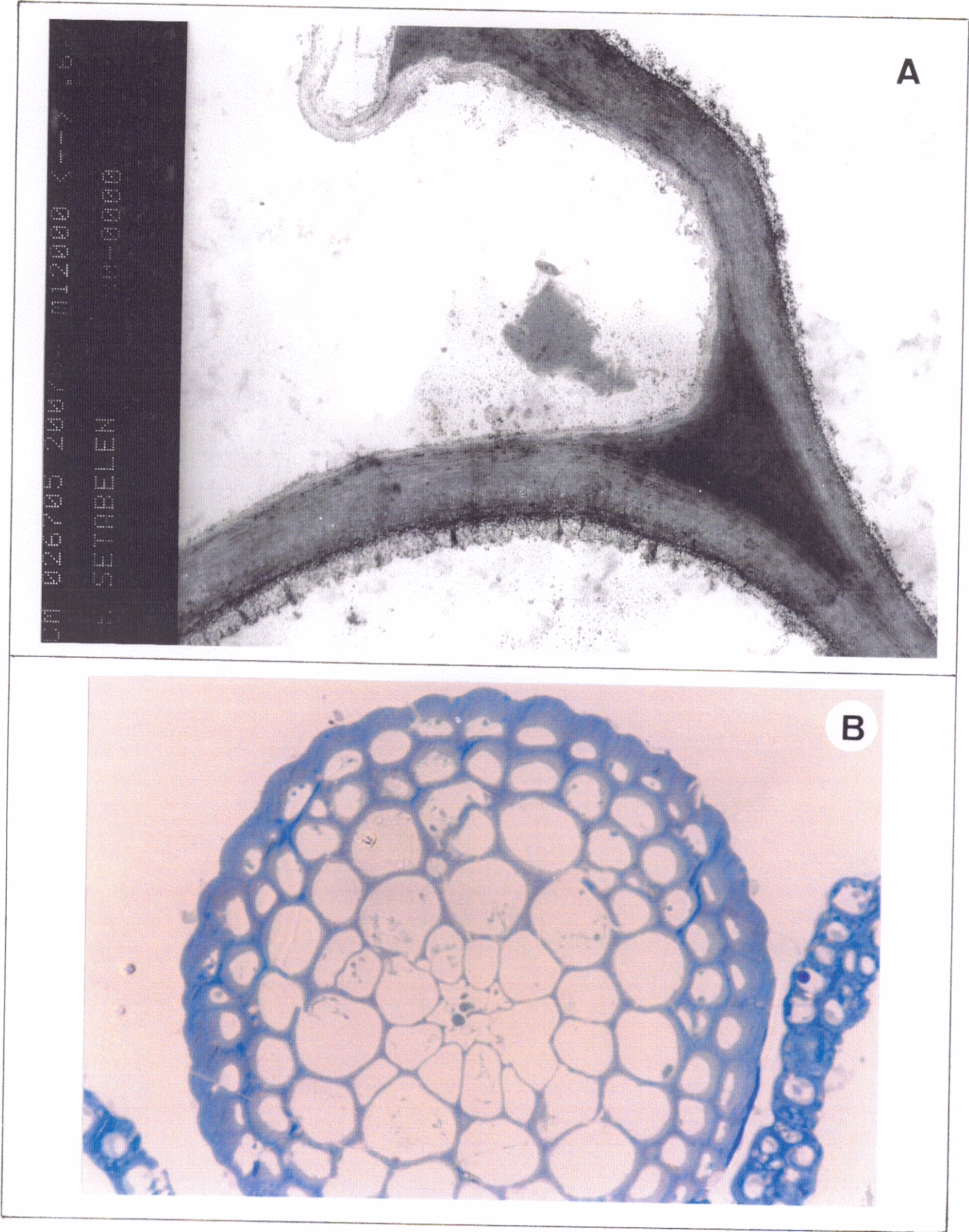
---

**Fig. 17. A:** Corte transversal de seta de *Gr. elatior*, contacto entre hidroma y parénquima, a MET. **B:** Corte transversal de seta de *Gr. elatior*, teñida con azul de metileno, 600×.

---



Fig. 17







**Gr. funalis**

SETA

Diámetro de 110-120  $\mu\text{m}$ .

La epidermis está formada por células de 10-12  $\mu\text{m}$  en su dimensión tangencial, 12-15  $\mu\text{m}$  en la radial y 20-30  $\mu\text{m}$  en la longitudinal (fig. 18 B). Es uniestrata en la base de la seta, a partir de la zona media comienza a formarse un segundo estrato y, ocasionalmente y de manera irregular en el contorno de la seta, en niveles superiores se desarrolla un tercero. Sólo a esta altura se manifiesta la tendencia de las células epidérmicas de capas contiguas a disponerse opuestas entre sí.

El parénquima está constituido por 3 (ocasionalmente 4) estratos de células de 20-30  $\mu\text{m}$  de dimensión longitudinal, y aproximadamente isodiamétricas en sección transversal, con diámetro de 15-20  $\mu\text{m}$ , en general máximo en la capa central (fig. 18 B).

Los hidroides, de 20-30  $\mu\text{m}$  en su eje longitudinal y 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro en sección transversal, forman una traza central de contorno irregular (fig. 18 B), con 10-15 células desde el nivel basal hasta zonas cercanas a la cápsula, donde desaparece.

En la epidermis y el parénquima la pared primaria posee una densidad electrónica media, con una estructura fibrilar densa, no diferenciable en el interior de los trígonos, que se orienta paralelamente al contorno del lumen celular. Ocasionalmente se aprecia una fina banda, más clara al microscopio electrónico de transmisión, que la delimita (fig. 18 A). Su grosor en los lados de la pared oscila entre 0,1 y 0,3  $\mu\text{m}$ , salvo en los que constituyen la periferia de la seta, donde alcanza 1  $\mu\text{m}$ .

La pared secundaria es biestrata. El estrato externo tiene un aspecto de fibrillas densamente dispuestas con orientación paralela al contorno del lumen celular, con una densidad electrónica relativamente escasa, mientras que el interno es granular, opaco (fig. 18 A). En la cara tangencial externa de las células periféricas, la pared secundaria alcanza 7  $\mu\text{m}$  de grosor frente a 0,5 en la correspondiente interna. Esta asimetría se reduce gradualmente hacia el interior, hasta desaparecer en el parénquima interno, donde el grosor de la pared es de 0,3  $\mu\text{m}$ .

La transición entre epidermis y parénquima es gradual cuando existe un estrato en proceso de diferenciación a epidermis (fig. 18 B). En niveles superiores, la delimitación entre ambos tejidos es más nítida si no se diferencia el tercer estrato.

Se observan plasmodesmos en paredes transversales no agrupados en campos de punteaduras primarias (figs. 18 A, C).

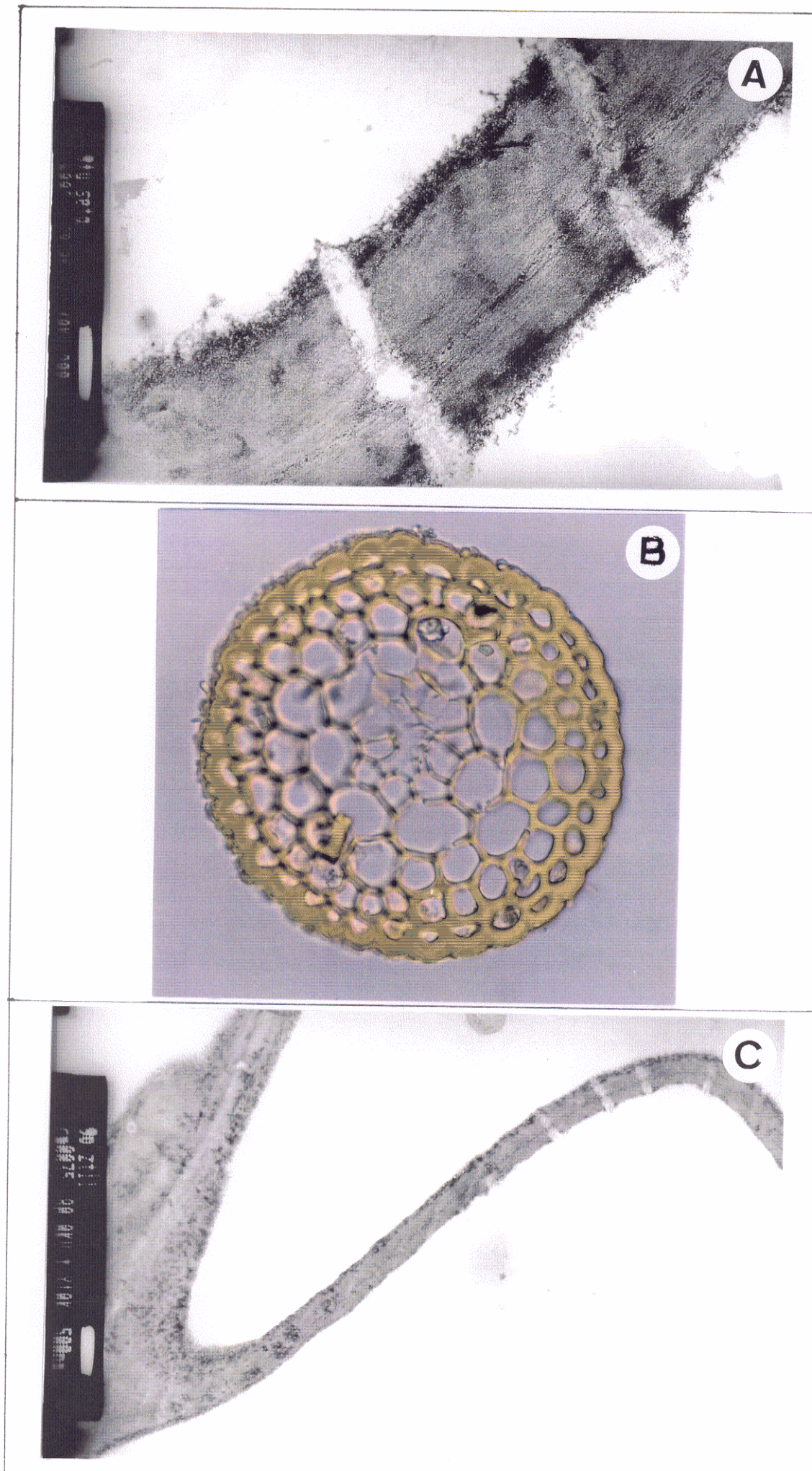
La pared de los hidroides aparece degenerada. En el contacto entre el hidroma y el parénquima interno, la cara de la pared que corresponde a este tejido mantiene su estructura, en tanto que la perteneciente a los hidroides aparece degradada. Los trígonos en que confluyen estas células presentan una estructura de la pared primaria semejante a la de los otros tejidos. Están bordeados por una pared secundaria poco densa a los electrones, uniestrata, ocasionalmente delimitada internamente por una banda estrecha más opaca. Los lados de la pared, de 0,2  $\mu\text{m}$  de espesor, que no presentan interrupciones, están formados por un material continuo con la pared secundaria en los trígonos, en el que se diferencia la lámina media, así como restos de la pared primaria.

---

**Fig. 18. A:** Corte longitudinal de seta de *Gr. funalis*, pared celular transversal del parénquima, con plasmodesmos (detalle), a MET. **B:** Corte transversal de seta de *Gr. funalis*, reacción con potasa, 600 $\times$ . **C:** Corte longitudinal de seta de *Gr. funalis*, pared celular transversal del parénquima, con plasmodesmos, a MET.

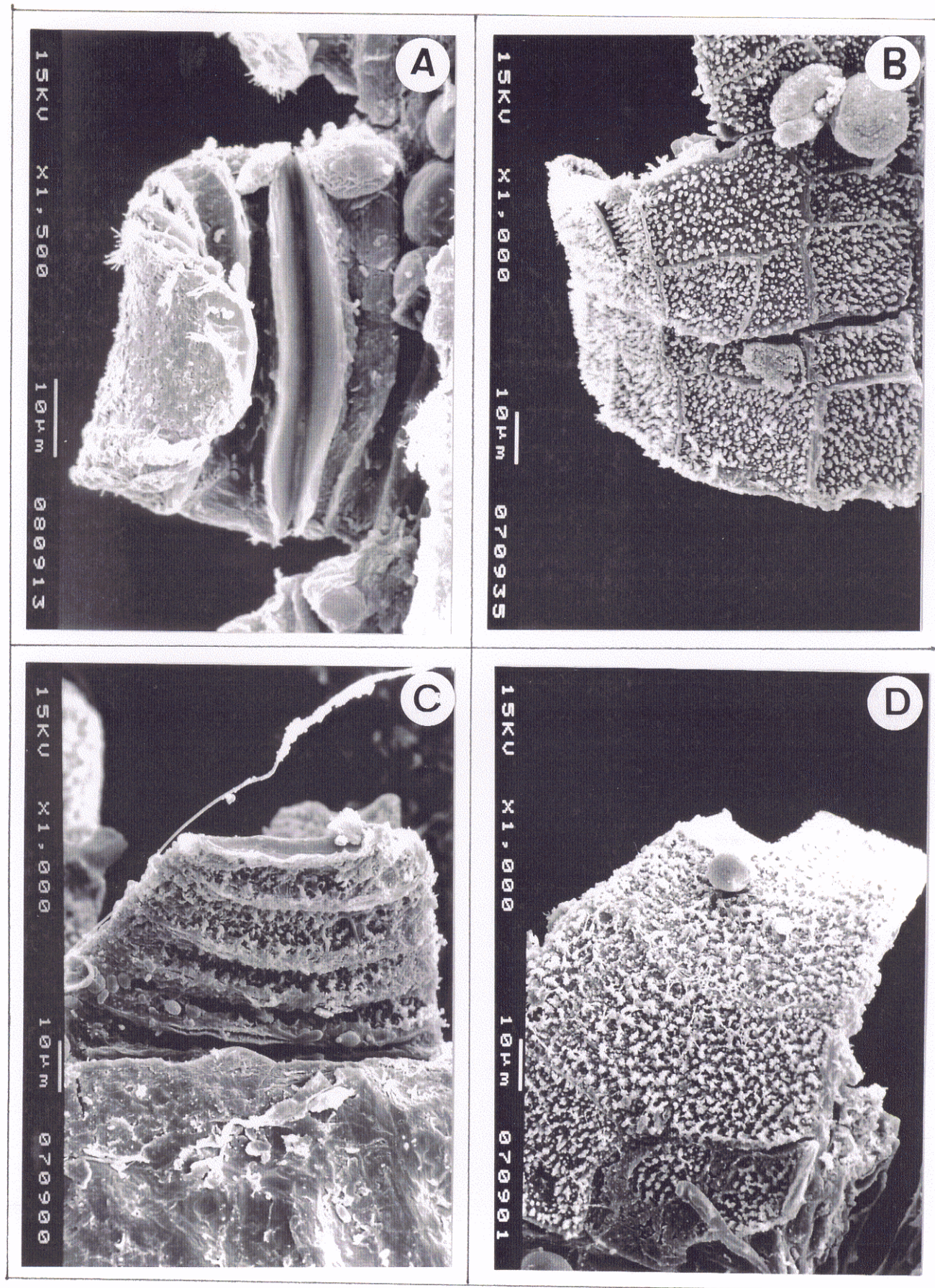
**Fig. 19. A:** Perístoma de *Gr. funalis*, cara externa, a MEB. **B:** Perístoma de *Gr. funalis*, cara interna, a MEB. **C:** Perístoma de *Gr. orbicularis*, cara externa, a MEB. **D:** Perístoma de *Gr. orbicularis*, cara interna, a MEB.

---













La pared reacciona débilmente para la detección de celulosa, y fuertemente para las sustancias fenólicas, así como (salvo en la epidermis) para la pectina.

El citoplasma aparece con avanzada degeneración. Se observan abundantes acúmulos lipídicos, predominantemente neutros o mezclas de ácidos y neutros (especialmente en las células epidérmicas y en los hidroides), restos vacuolizados y, ocasionalmente, cloroplastos en las células periféricas. Se aprecian también señales de invasión de microorganismos en la pared celular, en forma de túneles paralelos a la orientación de las microfibrillas, aunque no se han visto las células responsables de esta degradación.

#### *PERÍSTOMA*

Dientes anchamente lanceolados, romos, enteros y rectos.

Su cara externa presenta resaltes prominentes. La superficie es prácticamente lisa, con ornamentación reducida a escasas estrías verticales, sinuosas (fig. 19 A).

En su cara interna se remarcan medianamente los contornos de las células de la capa peristomática interna, y está recubierta densamente por grandes papilas, especialmente en su tercio apical (fig. 19 B).



***Gr. orbicularis***

*SETA*

Diámetro de 120  $\mu\text{m}$ .

La epidermis está formada por células de 10-12  $\mu\text{m}$  de dimensión radial, 10-12  $\mu\text{m}$  en la tangencial (lumen de 5-7  $\mu\text{m} \times$  7-10  $\mu\text{m}$ , respectivamente), y 30-40  $\mu\text{m}$  en la longitudinal. En el extremo basal de la seta, la epidermis posee un estrato, y a partir de su parte media y hasta el cuello de la cápsula, dos (fig. 20 B). Las células epidérmicas del segundo tienden a disponerse opuestas a las del primero.

El parénquima está frecuentemente formado por 3 estratos (ocasionalmente 4), con células de 30-40  $\mu\text{m}$  en el eje longitudinal de la seta, isodiamétricas en sección transversal, de tamaño muy variable, con diámetro de 7-25  $\mu\text{m}$ , generalmente máximo en el estrato contiguo al más interno (fig. 20 B).

Los hidroides, por la fuerte sinuosidad (tal vez por un artefacto de la deshidratación e inclusión), y degradación de sus paredes, son muy difícilmente mensurables. Forman una traza central de contorno irregular, y su número, superior a 15 en la base de la seta, decrece hacia el ápice hasta quedar reducido a 3-4 ó, en ocasiones, desaparecer.

En las paredes celulares de la epidermis y del parénquima se observa un estrato primario bastante opaco a los electrones, excepto en una estrecha banda, algo más clara, que lo separa del secundario, en apariencia compuesto por fibras muy finas y densamente empaquetadas paralelamente al contorno del lumen celular (en el interior de los triángulos no se percibe ninguna estructura), fig. 20 A. En los lados de la pared es muy delgado (0,15  $\mu\text{m}$ ), con excepción de los que conforman la periferia de la seta, donde pueden alcanzar 0,75-1  $\mu\text{m}$  de espesor .

La pared secundaria es ligeramente más transparente a los electrones que la primaria y presenta un aspecto fibrilar más laxo, de orientación igualmente paralela al contorno del lumen, con gránulos opacos, más abundantes en la zona de síntesis más reciente (fig. 20 A). En las células periféricas presenta grandes diferencias de grosor entre las paredes tangenciales externas (donde alcanza 5  $\mu\text{m}$ ) y las internas (0,2  $\mu\text{m}$ ). Hacia el interior de la seta esta asimetría se reduce progresivamente, hasta igualarse el grosor en ambas caras tangenciales de la pared (0,5  $\mu\text{m}$ ). No se observa en ella subestratificación.

La transición entre la epidermis y el parénquima, considerando la forma de las células y sus paredes, es siempre gradual, dada la presencia, a lo largo de toda la seta, de un estrato intermedio, que hacia el extremo superior adquiere progresivamente características epidérmicas.

La pared de los hidroides muestra un alto grado de degeneración. En la zona de confluencia de las células, los trígonos aparecen enteros, más densos a los electrones que en los otros tejidos, sin que se observe la banda más clara de la pared primaria. La pared secundaria que los rodea es muy delgada (0,1  $\mu\text{m}$ ), con escasa densidad electrónica, se separa frecuentemente de ellos dejando un espacio intermedio muy variable, y presenta una estructura irregularmente granulosa. Los lados de la pared, muy delgados (de grosor inferior a 0,1  $\mu\text{m}$ ), sinuosos y con frecuentes discontinuidades, se observan formados por un material laxo y amorfo, igualmente transparente a los electrones, en el que resulta imposible diferenciar pared primaria y secundaria. De su continuidad con la pared secundaria en el nivel de los trígonos se deduce la participación de ésta en los lados. En los puntos donde el hidroma entra en contacto con las células del parénquima interno, tan sólo la pared secundaria parenquimática, aun adelgazada, mantiene su estructura y su continuidad, en tanto que el estrato primario de ambos tipos celulares y el secundario de los hidroides degeneran en la estructura de pared observada en éstos.

En el conjunto de la pared, la pectina se detecta bastante débilmente. Se aprecia, sin embargo, una importante presencia de sustancias fenólicas, especialmente en las paredes epidérmicas y en los trígonos parenquimáticos. Se indica la fuerte reacción demostrativa de la presencia de celulosa (excepto, como es general en las seis especies, en la banda periférica).

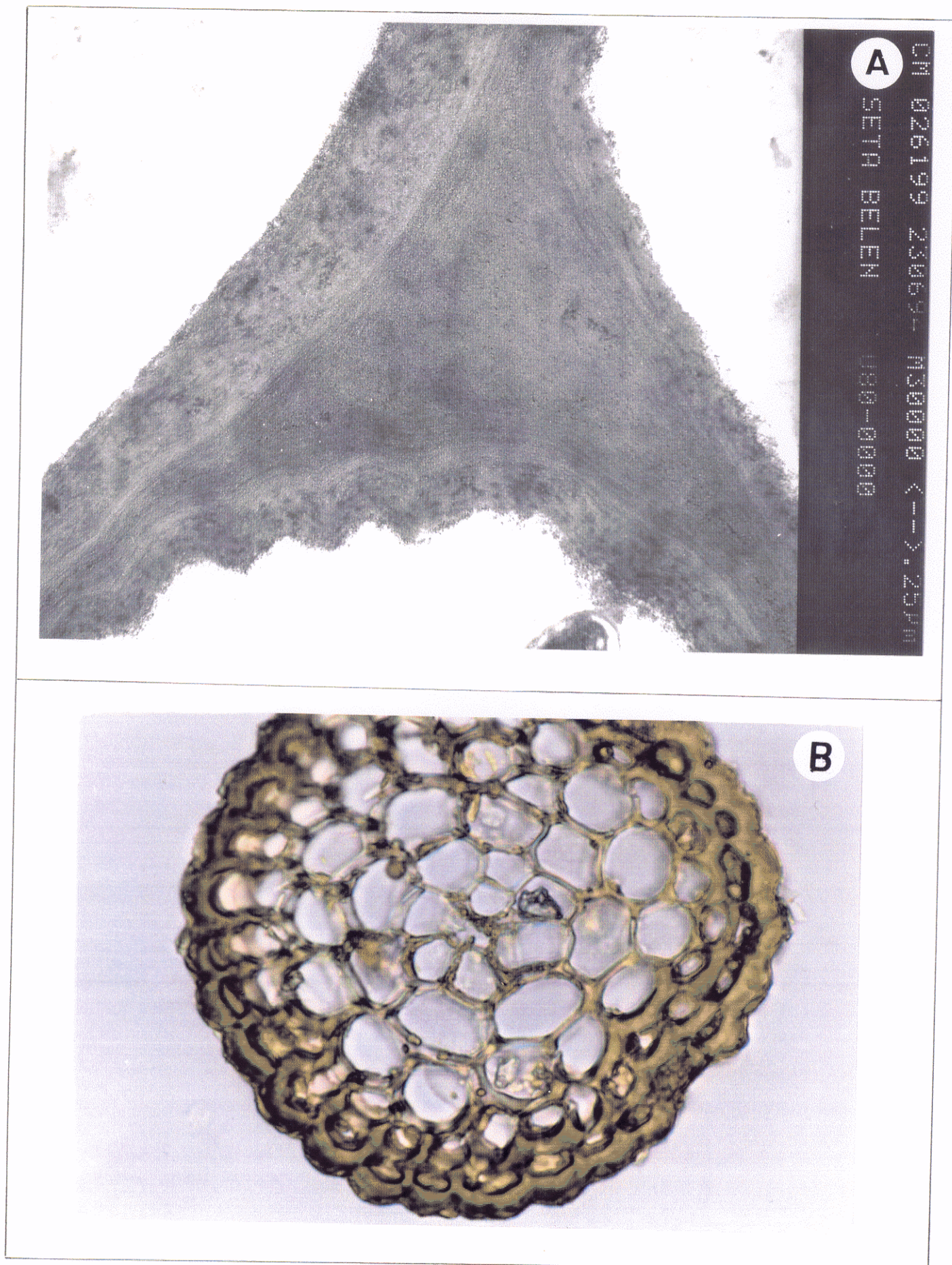
En cuanto al citoplasma, al microscopio electrónico de transmisión tan sólo se han observado restos de mitocondrias, estructuras membranosas y lípidos en muy escasas células. En cambio, ha aparecido, especialmente en la zona central de la seta, un gran número de microorganismos, de organización eucariota unos y procariota otros, tanto en el lumen celular como dentro de las paredes, en las que abren grietas paralelas a las fibrillas en que éstas se organizan, atraviesan completamente los trígonos, y son posiblemente responsables también de las roturas perpendiculares a la pared que se observan. Se remarca el hecho de que, en el espécimen esporofítico en el que se apreció la presencia de estos organismos, estaban ausentes tanto de la zona de transición como de la cápsula, que mostraban un desarrollo normal de tejidos y de células. De igual modo, hay que indicar que, en otras secciones de seta, se han observado al microscopio óptico cloroplastos y gotas lipídicas con mucha mayor abundancia.

La aplicación del azul de Nilo sobre los lípidos citoplásmicos produce coloraciones azules, rosadas y violáceas, indicando la presencia de acúmulos de lípidos ácidos, de lípidos neutros y de mezclas de ambos tipos, respectivamente.

---

Fig. 20. A: Corte transversal de seta de *Gr. orbicularis*, trigono del parénquima, a MET. B: Corte transversal de seta de *Gr. orbicularis*, reacción con potasa, 850×.







*PERÍSTOMA*

Dientes anchamente lanceolados, irregularmente bi- o trifurcados en su extremo distal por perforaciones y aberturas longitudinales.

Su cara externa presenta resaltes medianamente acusados, y está ralmente recubierta por estrías verticales, sinuosas, y por papilas ramificadas (fig. 19 C).

En su cara interna apenas se distinguen los contornos de las paredes celulares del estrato peristomático interno, y está densamente tapizada, en especial su tercio apical, por papilas ramificadas y anastomosadas irregularmente (fig. 19 D).

### *Gr. pulvinata*

#### SETA

Diámetro de 120-150  $\mu\text{m}$ .

La epidermis presenta una cutícula marcadamente gruesa (0,6  $\mu\text{m}$ ) en relación a las otras especies. Las células epidérmicas miden 8-10  $\mu\text{m}$  en su dimensión tangencial, 10-12  $\mu\text{m}$  en la radial (lumen de 5-8  $\mu\text{m} \times$  3-5  $\mu\text{m}$ , respectivamente), y 50-100  $\mu\text{m}$  en la longitudinal. Este tejido, ya desde su nivel basal, consta de 2 estratos (en ocasiones, de manera irregular, se distingue un tercer estrato). En la parte media de la seta el tercero suele estar completamente formado, y hacia niveles superiores se constituye un cuarto (fig. 22 A), que cerca del extremo apical es frecuentemente continuo. Se observa claramente, entre las células de estratos adyacentes, la tendencia a disponerse opuestas.

El parénquima está formado por células de 50-100  $\mu\text{m}$  en su eje longitudinal, aproximadamente isodiamétricas en sección transversal (con tendencia a alargarse radialmente las interiores), con diámetro de 8-15  $\mu\text{m}$  (máximos valores en la capa central). Se disponen en tres estratos, o dos en niveles altos de la seta (fig. 22 A).

Los hidroides forman una traza de contorno irregular, de 12-15 células en la base, aunque este número se reduce paulatinamente hacia la parte superior hasta 3-4, o desaparecer. El diámetro de los hidroides es de 5-8  $\mu\text{m}$  (fig. 22 A).

---

**Fig. 21.** A: Corte transversal de seta de *Gr. pulvinata*, trígono del hidroma, con depósitos cristalinos, a MET. B: Corte transversal de seta de *Gr. pulvinata*, parénquima, a TEM.

**Fig. 22.** A: Corte transversal de seta de *Gr. pulvinata*, sin teñir, 600 $\times$ . B: Corte transversal de seta de *Gr. trichophylla*, reacción con potasa, 600 $\times$ . C: Corte transversal de seta de *Gr. trichophylla*, contacto de hidroma y parénquima, a MET.

---



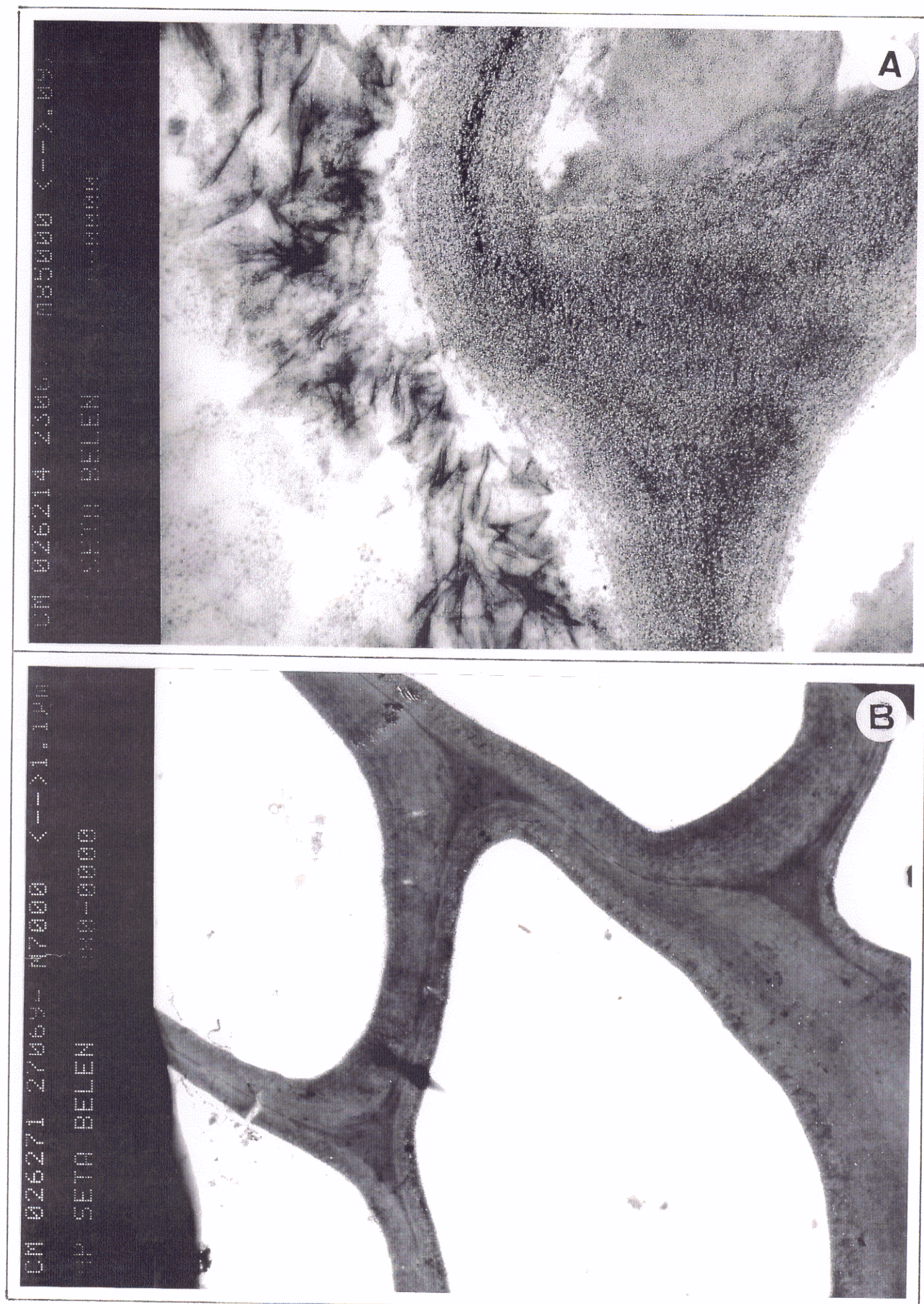
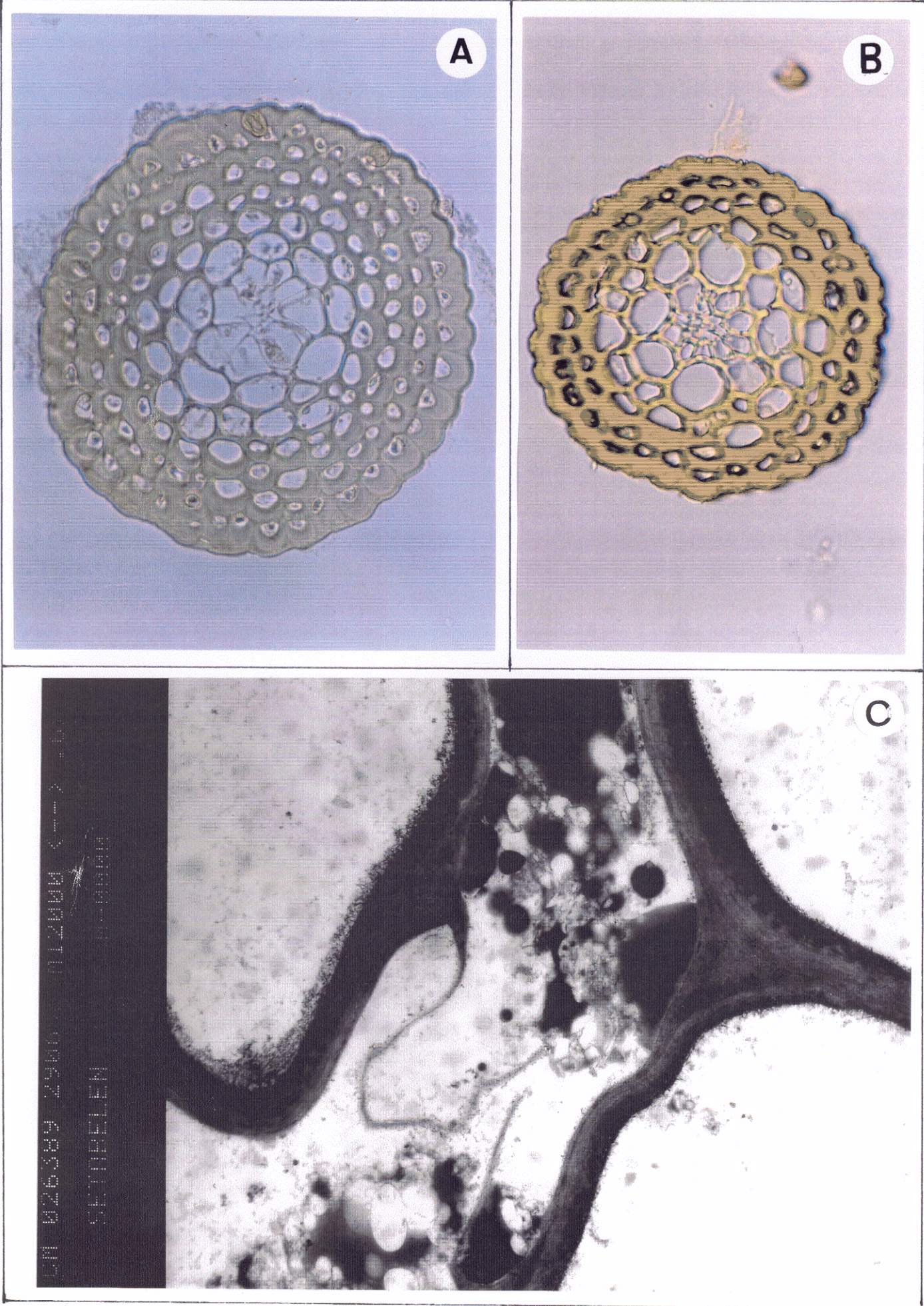






Fig. 22







En la epidermis y el parénquima, la pared celular primaria aparece con una densidad electrónica media, compuesta por fibrillas orientadas paralelamente al contorno del lumen celular (en los trígonos no se distingue la estructura). Una estrecha banda más transparente a los electrones, no siempre conspicua, la delimita internamente (fig. 21 B). En los lados, el grosor es de 0,1  $\mu\text{m}$ , excepto en los que constituyen la banda periférica (donde no supera 0,3-0,5  $\mu\text{m}$ ).

La pared secundaria es asimismo de densidad electrónica media (salvo, ocasionalmente, una fina banda que la bordea externamente), subdividida en dos estratos: uno externo, laxamente fibrilar, que hacia el interior se vuelve progresivamente reticular, y que marca la variabilidad en cuanto a grosor de la pared secundaria; y uno interno reticulado-granular, electrondenso (fig. 21 B). El grosor de las paredes secundarias tangenciales externas e internas es, respectivamente, de 0,6  $\mu\text{m}$  y 0,1  $\mu\text{m}$ . Hacia el interior, estas diferencias decrecen progresivamente, aunque no siempre desaparecen del todo. En el parénquima interno, el grosor es de 0,15-0,25  $\mu\text{m}$ .

En función de la forma de las células y de las características de sus paredes, la transición entre epidermis y parénquima es gradual, por la presencia de un estrato intermedio que va adquiriendo hacia niveles superiores características epidérmicas. Sólo en el extremo apical puede apreciarse una delimitación más clara entre ambos tejidos.

En los hidroides la pared es degradada, aunque continua. En el contacto con el parénquima interno, sólo la cara orientada hacia la traza presenta esta característica. Los trígonos de los hidroides presentan una estructura de retículo laxo, y resulta imposible distinguir una pared secundaria bordeándolos (fig. 21 A). Los lados, de 0,3  $\mu\text{m}$  de grosor, aparecen con un aspecto igualmente amorfo, y solamente se distinguen trazos discontinuos de la lámina media.

La pared celular da una reacción de intensidad media con respecto a la detección de celulosa, y alta en cuanto a la de pectinas y sustancias fenólicas (éstas últimas, especialmente en los engrosamientos epidérmicos).

El citoplasma aparece con un alto grado de vacuolización. Se encuentran, sin embargo, con cierta frecuencia, cloroplastos en las células periféricas. Se observan abundantes acúmulos lipídicos (constituidos predominantemente por ácidos o mezclas de ácidos y neutros). Las células centrales de la seta (hidroides y parénquima interno) presentan en el lumen celular, bordeando las paredes, abundantes cristales aciculares de composición desconocida (fig. 21 A). Se aprecian, asimismo, aberturas en las paredes, paralelas a las fibrillas, probablemente realizadas por microorganismos, que no han sido observados.

#### *PERÍSTOMA*

Dientes lanceolados, rectos, irregularmente divididos en 2-4 ramas por fenestras o aberturas longitudinales.

Su cara externa presenta resaltes de escaso relieve, y está ornamentada por papilas ramificadas que la tapizan muy densamente, aunque de forma desigual, por estar a menudo irregularmente erosionadas, descubriendo áreas lisas en la superficie (fig. 23 A).

En su cara interna los contornos de las paredes celulares de la capa peristomática interna están poco marcados, y está muy densamente recubierta por papilas ramificadas (fig. 23 B).

No se han observado estrías verticales en la ornamentación de los dientes peristomáticos de esta especie.

***Gr. trichophylla***

**SETA**

Diámetro de 110-140  $\mu\text{m}$ .

La epidermis (fig. 22 B) consta de células de 12-15  $\mu\text{m}$  en su dimensión tangencial, 12-15  $\mu\text{m}$  en la radial (10-12  $\mu\text{m} \times 3-7 \mu\text{m}$ , respectivamente, en el lumen) y 50-70  $\mu\text{m}$  en la longitudinal. En la parte basal de la seta forman un estrato continuo, y un segundo irregularmente constituido. Hacia la parte media, el segundo estrato se hace continuo a lo largo de todo el contorno, y ocasionalmente, en niveles superiores aparece, siempre irregularmente, un tercer estrato.

El parénquima está formado por 2 ó 3 capas de células de 50-70  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal y más o menos isodiamétricas en corte transversal, con diámetro de 8-15  $\mu\text{m}$ , con los mínimos valores en las más internas (fig. 22 B).

La traza central, de contorno aproximadamente circular, consta de 8-10 hidroides, con diámetro de 5-8  $\mu\text{m}$ , en la base de la seta (fig. 22 B). Su número va disminuyendo hacia niveles superiores hasta desaparecer.

Las células de la epidermis y el parénquima presentan una pared primaria de mediana densidad electrónica, compuesta por fibrillas densamente dispuestas en paralelo al contorno del lumen celular (en el interior de los triángulos es indistinguible esta estructura), y delimitada por una banda estrecha, normalmente conspicua, más transparente a los electrones (fig. 22 C). Su grosor en los lados es de 0,1-0,2  $\mu\text{m}$ , excepto en los que forman la periferia de la seta, donde alcanza 1  $\mu\text{m}$ .



La pared secundaria es biestrata, con un estrato de estructura fibrilar, medianamente opaco a los electrones, responsable de la variabilidad conjunta del grosor; y otro granular, muy electrondenso. Ocasionalmente aparece un tercero hacia el interior, de estructura reticular muy laxa (fig. 22 C). En las paredes tangenciales de las células periféricas, el grosor es de aproximadamente 0,6  $\mu\text{m}$  en la cara externa, frente a 0,2 en la interna. Hacia el interior las diferencias decrecen hasta igualarse el grosor de ambas caras a 0,3  $\mu\text{m}$ .

La transición entre la epidermis y el parénquima, considerando la forma de las células y los caracteres de sus paredes, es siempre gradual.

Las paredes de los hidroides están degradadas, sin que esto afecte a la cara de la pared de las células parenquimáticas internas en contacto con ellos (fig. 22 C). Los trígonos muestran una estructura de pared primaria semejante a la de los otros tejidos, sin embargo, la pared secundaria que los bordea apenas es perceptible. Los lados presentan un grosor de 0,1-0,2  $\mu\text{m}$ , con una estructura amorfa, donde se distingue la lámina media, y que frecuentemente aparecen interrumpidos o totalmente disgregados.

Las pruebas histoquímicas realizadas sobre las paredes detectan débilmente la celulosa, e intensamente las pectinas y las sustancias fenólicas. Se indica la coloración anaranjado-rojiza que presentan las secciones de setas de años anteriores en presencia de soluciones alcalinas.

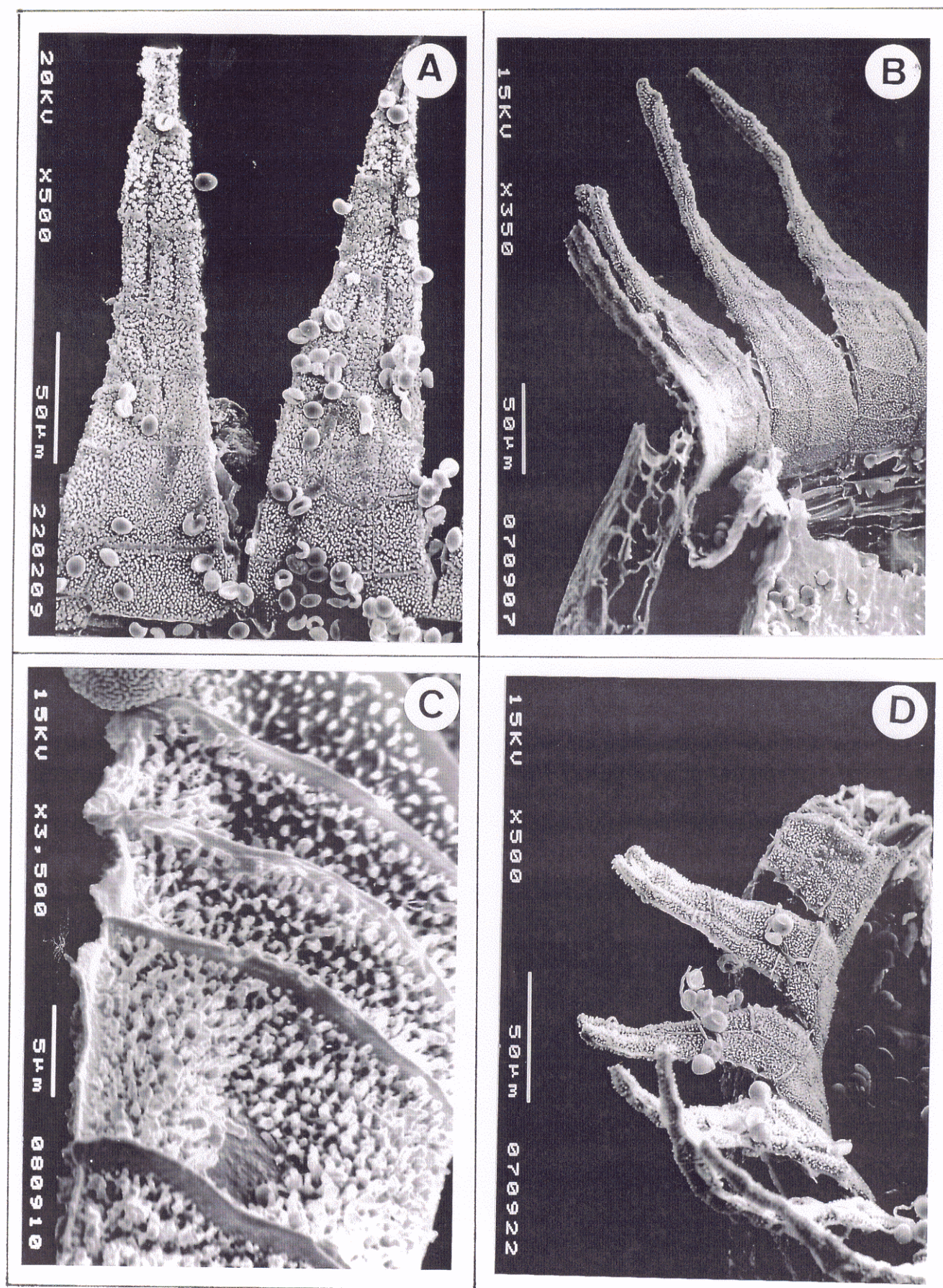
En el citoplasma se observan abundantes cloroplastos en la epidermis y en el parénquima al microscopio óptico. Al electrónico de transmisión se aprecian, incluso en los hidroides, abundantes restos vacuolizados y acúmulos lipídicos, constituidos tanto por lípidos ácidos o neutros por separado como por mezclas. No se han observado microorganismos ni señales de degradación producidas por ellos.

---

Fig. 23. A: Perístoma de *Gr. pulvinata*, cara externa, a MEB. B: Perístoma de *Gr. pulvinata*, cara interna, a MEB. C: Perístoma de *Gr. trichophylla*, cara externa, a MEB. D: Perístoma de *Gr. trichophylla*, cara interna, a MEB.

---









**PERÍSTOMA**

Dientes linear-lanceolados, rectos o ligeramente flexuosos, enteros o bifurcados solamente en el extremo apical (menos de un octavo de su longitud total).

Tanto la cara externa como la interna presentan los contornos de las células de las capas peristomáticas primaria e interna, respectivamente, con mediano relieve, así como un recubrimiento muy denso de papilas ramificadas, que puede estar ocasionalmente erosionado de forma irregular en la superficie, mostrando áreas sin ornamentación (figs. 23 C, D).

No se han hallado estrías verticales entre los relieves observados en los dientes peristomáticos.

## ANATOMÍA: DISCUSIÓN

### Esporófito

#### SETA

La comparación con los datos previamente conocidos es forzosamente limitada. Aparte de los trabajos pioneros, reseñados en la introducción, que dan una denominación a los tejidos presentes, en general, en la seta, se han publicado escasos estudios sobre anatomía del esporófito, y aún menos que incluyan observaciones ultraestructurales. La mayoría se refieren casi exclusivamente a los tejidos conductores. En particular para este género, sólo se conocen unas observaciones de Lorch (1931) acerca de la presencia en especies de *Grimmia* de traza de hidroides en la seta, y unos dibujos a cámara clara de Deguchi (1978), comentados muy en general, sin referirse a la variabilidad de los tejidos en cada especie, y sin incluir ninguna de las aquí descritas.

La torsión de la seta se considera un carácter típico de muchos musgos, especialmente xerofíticos (Vitt 1981). En esta familia se conocen especies dextrorsas y sinistrorsas (Deguchi 1978, Vitt 1981). Todas las observadas han resultado sinistrorsas, lo que se corresponde con las observaciones de Deguchi (1978) para el género *Grimmia*, y las asemeja a *R. fasciculare* y al grupo de *R. heterostichum* (Vitt 1981).

La presencia de una cutícula (fig. 15 A) concuerda con lo enunciado por Héban (1977) como general para los esporófitos briofíticos. El depósito en ella de los colorantes tipo Sudán demuestra su naturaleza lipídica. Debe estar constituida predominantemente por compuestos insaturados, puesto que no se tiñe con tetróxido de osmio.

Se destaca en todos los casos la especialización de la epidermis, en cuanto a la forma de las células y a las características de su pared. De hecho, considerando el escaso desarrollo de la traza central de hidroides y la pobre diferenciación del parénquima, es este tejido periférico el que marca el diverso grado de especialización de la seta. La forma de media luna, debida al arqueamiento de las paredes tangenciales externas, así como la profunda asimetría del estrato secundario entre las paredes tangenciales externas y las internas, no han sido observadas hasta la fecha en otras familias de musgos (Favali & Gianni 1973, 1975, Bassi & Favali 1973). En los especímenes estudiados por estos autores, sólo el grosor de la pared y el menor diámetro celular definen este tejido. En Grimmiaceae, Deguchi (1978) menciona, para especies distintas a las aquí consideradas, la forma convexa del estrato periférico, pero sin extender esta observación a los siguientes estratos epidérmicos ni atribuirle a una característica específica de la pared. Aunque la transición epidermis-parénquima suele ser gradual (al igual que se observa en otras especies), por lo que la epidermis no puede considerarse altamente especializada, los caracteres aquí observados marcan un grado más alto de diferenciación epidérmica. La utilidad de este carácter para el diagnóstico taxonómico, o para consideraciones filogenéticas, por la escasez de estudios, está todavía por valorar.

En cuanto a su denominación, por constituir un refuerzo externo, debido a los engrosamientos secundarios de pared, podría definirse como un estereoma, considerando exclusivamente su función de sostén. Previamente otros autores han denominado así este tejido de la seta (Wijk 1932). En esta tesis se ha preferido utilizar el término "epidermis", por su posición, por retener la vitalidad de sus células más que los restantes tejidos y por los anteriormente mencionados caracteres específicos.

Se remarca que, de forma invariable, este tejido es más desarrollado en niveles superiores de la seta, con lo que, más que contribuir al mantenimiento de su forma, parece orientada a garantizar la protección de la inserción de la cápsula, y de los procesos de conducción de nutrientes hacia ésta que parecen predominar en la zona distal de la seta. Su papel puede que sea eficaz, dado que no se ha observado degradación de sus paredes por parte de microorganismos. En esta función defensiva es probable la implicación de los engrosamientos periféricos de las paredes primarias, que constituyen una banda diferenciada con alto acúmulo de sustancias fenólicas. Se destaca que, en la única especie donde se observa un escaso grosor de esta banda exterior (*Gr. pulvinata*), la cutícula, en compensación, se presenta notablemente más engrosada.

La tendencia de las células epidérmicas a disponerse opuestas con respecto a las del estrato contiguo parece relacionada con un alto grado de diferenciación de este tejido. Su significado biológico es desconocido, aunque puede suponerse implicado en producir una acanaladura más pronunciada de la superficie de la seta al iniciarse el colapso de sus tejidos por deshidratación, de modo que se formasen canales capilares que facilitaran la rápida toma de agua, contribuyendo a su recuperación.

Dentro de las especies estudiadas, el grado de especialización de este tejido es variable. La epidermis más desarrollada corresponde a *Gr. pulvinata* (fig. 22 A), mientras que el menor grado corresponde a *Gr. orbicularis* (fig. 20 B). Estas dos especies han resultado siempre diferenciables en función del número de estratos de la epidermis, por lo que se propone este carácter para su diagnóstico. Las restantes presentan solapamiento en cuanto a su intervalo de variación, por lo que no se pueden independizar a este respecto. Sin embargo, se puede apuntar una tendencia al mayor desarrollo en *Gr. decipiens*, y al menor, en *Gr. funalis*.



A la luz de los datos conocidos en musgos, es imposible por el momento dilucidar si la tendencia evolutiva en la sección se ha orientado hacia una simplificación o hacia un aumento de la complejidad epidérmica.

En cuanto al parénquima, parece estar compuesto por células poco especializadas, y su variabilidad deberse al grado de diferenciación epidérmica, más que a una propia diversidad de desarrollo. El alargamiento radial de las células más internas puede interpretarse como una proyección hacia la traza de hidroides, producida por la diferencia de presión de turgor establecida entre ambos tejidos en el momento de colapsar los hidroides sin haber desaparecido la actividad celular parenquimática (figs. 15 B y 22 A). La transición entre los estratos externos y los internos es gradual, solamente se destaca la capa celular más interna de *Gr. elatior* por aparecer su pared bruscamente adelgazada con respecto a la contigua.

La traza de hidroides no ofrece una acusada variabilidad en estas especies. Compuesta por escasas células (normalmente no más de 15), muestra un alto grado de degradación parietal que, sin embargo, no afecta aparentemente, salvo en *Gr. pulvinata*, a los trígonos (sugiriendo una composición diferencial), ni es tan avanzada como para eliminar por completo este tejido dejando una laguna central, como describen en otras especies Bassi & Favali (1973) y Héban (1977). La degeneración conlleva la desestructuración de la pared, donde en casos avanzados no puede distinguirse el estrato primario del secundario. El lumen, siempre sin protoplasto, presenta frecuentemente restos celulares y acúmulos lipídicos (fig. 22 C). La irregularidad del contorno de la traza puede deberse al colapso frente a la presión de turgor del parénquima, cuyas células no presentan formas regulares.

La delimitación de este tejido, siempre clara, se explica por su distinto origen embrionario. Puesto que la degradación de sus paredes no afecta a las contiguas parenquimáticas, debe haber diferencias en la naturaleza u orientación de los componentes de pared de ambos tejidos.

En cuanto a las paredes celulares epidérmicas y parenquimáticas, se repite un mismo patrón de pared primaria de estructura invariable para cada especie, y pared secundaria responsable de la variabilidad celular de estos tejidos en la seta (fig. 20 A). Las poco marcadas diferencias entre las especies en cuanto a su densidad electrónica, así como las relativas al grosor y a la estratificación de la pared primaria, pueden deberse a artefactos de tinción y a la constricción, más o menos intensa, sufrida por este estrato tras la deposición del secundario.

Sin embargo, existe cierta variabilidad en la estratificación en la pared secundaria, probablemente propia de cada especie. El esquema básico es la presencia de un estrato externo fibrilar, relativamente laxo, de grosor variable, y uno interno granular, muy electrondenso, frecuentemente seguido de un tercer estrato reticular, laxo, que proviene tal vez de la degradación de éste (fig. 17 A). En tanto que *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla* se ajustan a él, *Gr. orbicularis* y *Gr. funalis* destacan por la densidad del estrato fibrilar y por no mostrar el tercero. *Gr. elatior* presenta de forma constante sólo el estrato externo, peculiarmente subdividido en bandas de grosor variable, aunque ocasionalmente pueden aparecer los otros. El estrato de más antigua deposición en *Gr. decipiens* presenta frecuentemente aspecto fibrilar-granular.

En cuanto al desarrollo y asimetría de la pared secundaria, no se aprecian diferencias notables entre las seis especies.

La actividad citoplásmica encontrada ha sido muy escasa. Esto puede deberse a la elección de la zona proximal de la seta para el estudio a microscopía electrónica de transmisión. Según recoge Vitt (1981), la maduración del esporófito se produce en sentido acrópeto. Aunque el estado fenológico de la cápsula parecía sugerir alta actividad esporofítica, lo cierto es que las secciones observadas presentaban un avanzado grado de madurez. De forma peculiar, la epidermis ha resultado el último tejido en perder su organización citoplásmica, discrepando de lo observado por Bassi & Favali (1973) y Favali & Gianni (1973) en *Mnium* y *Tortula*, respectivamente.

Se ha puesto de manifiesto en esta fase una abundante presencia de lípidos. Su naturaleza parece variable en las distintas especies, pero, dado que el análisis realizado es exclusivamente aproximativo, sin que proporcione datos sobre la composición exacta y cantidades presentes, no es posible abordar consideraciones ecológicas, fenológicas o sistemáticas. Estas sustancias contrastan con la predominancia de almidón y polisacáridos solubles observada en el tercio apical de setas más jóvenes (fig. 13 B). Es posible que, durante el periodo de expansión de la cápsula y posterior meiosis de los esporófitos, sean estos glúcidos las sustancias de reserva más adecuadas para la producción de energía a corto plazo.

La presencia de polisacáridos, detectada de modo preferente en el parénquima interno, en continuidad con la que se muestra en la cápsula, parece sugerir para estas células una naturaleza conductora de nutrientes, similar a los leptoides, definidos en sentido estricto (Héban 1977), como células con paredes "nacaradas", que longitudinalmente presentan extremos ensanchados y grandes plasmodesmos en sus paredes transversales, sólo encontrados en la seta de *Polytrichales* y *Funaria*; o bien en sentido amplio (Bassi & Favali 1973, Favali & Gianni 1973), como células parenquimáticas algo diferenciadas morfológicamente, con paredes transversales abundantemente perforadas por plasmodesmos. Sin embargo, las observaciones que aquí se discuten muestran solamente células semejantes a las contiguas parenquimáticas, de paredes transversales con plasmodesmos en número relativamente escaso (figs. 18 A, C), no significativamente superior al presentado por las del resto del parénquima o de la epidermis. Es preciso investigar si esta especialización se produce efectivamente en la zona distal de la seta, o si la conducción preferente por parte de estas células no obedece a diferenciación celular.

Se describe por primera vez para el esporófito de musgos la presencia de microorganismos invasores (fig. 30 A), o de señales producidas por los mismos, frecuente en los tejidos de la seta en varias de las especies objeto de esta tesis. El hecho de que no siempre aparezcan, o de que se restrinjan a zonas muertas, parece sugerir que se trata de degradadores de pared oportunistas. Se destaca el hecho de su mayor abundancia en las zonas centrales y de que no ataquen las paredes epidérmicas, lo que indica que se abren camino desde niveles contiguos al observado, pero no directamente desde el exterior. La salvaguarda de las células epidérmicas puede deberse a la presencia de actividad celular que impida el desarrollo de estos microorganismos, o bien a la hipotética composición especial de sus paredes celulares. Una investigación a este respecto habría de revestir gran interés, tanto para la biología del musgo como para posibles aplicaciones prácticas.

Por último, la existencia de un depósito de apariencia cristalina en el lumen de *Gr. pulvinata* (fig. 21 A) se añade a las escasas referencias sobre cristales en briófitos, recogidas por Mann (1988). Por su situación intracelular y su regularidad de aparición bordeando el contorno de las paredes, se descarta que sea una contaminación o un artefacto. Aunque se ha observado aisladamente, es preciso tener en cuenta que, por su pequeño tamaño, pasan desapercibidos al microscopio óptico. Sería imprescindible una investigación acerca de la naturaleza, frecuencia y distribución de estos cristales para comprender el significado de su presencia.

## CÁPSULA

La tendencia de la cápsula a formas subglobosas se interpreta como una adaptación de los xerófitos para disminuir la superficie expuesta a la desecación en relación al volumen. En este sentido, la especialización más alta correspondería a *Gr. funalis* y *Gr. orbicularis*.

Vitt (1981) señala que una característica típica de la simetría de la cápsula de los musgos es la ocasional presencia de 8 ó 16 costillas longitudinales. El subgénero *Rhabdogrimmia*, al que pertenecen las seis especies analizadas, fue definido por Limpricht (1885-1889) en función de dichas costillas. Las posteriores observaciones de Cao & Vitt (1986) confirman la presencia de 8 costillas en las especies chinas de este subgénero. A este respecto se indica que, si bien se han observado estos relieves en la pared de la urna de las mismas, éstas no parecen ajustarse siempre al número postulado, ni aparecer con una separación regular entre sí, ni asociarse a otros elementos que marquen una simetría octogonal. Es posible que este carácter proceda de un patrón fijo, secundariamente irregularizado, en cuyo caso tendría sentido su utilización para diagnóstico de la sección, como lo han hecho Cao & Vitt (1986), pero esto no se ha demostrado.

Aunque no está suficientemente investigada, la aparente asociación de los estomas al extremo proximal de las costillas, aquí observada (fig. 12 B), parece en cierto modo confirmar la irregularidad de disposición de éstas, dado que el número de estomas, entre 6 y 15 (Paton & Pierce 1957, Deguchi 1978, Estébanez 1991), no es necesariamente 8, y están variablemente separados. Sería de interés estudiar el posible efecto de la deformación como mecanismo de diferenciación estomática.

Los tejidos existentes en el cuello responden al patrón general en briófitos (Vitt 1981). Con respecto al tejido clorofílico, la presencia de espacios irregulares correspondientes a cámaras subestomáticas (fig. 13 A) ha sido descrita previamente en Pottiaceae por Favali & Gianni (1973) y Abella (1994). La distribución de este tejido en 16 columnas (fig. 14 C) a lo largo de la pared, alineadas con los dientes del perístoma (en concordancia, pues, con la simetría radial octogonal característica), no ha sido previamente descrita en musgos, lo que sugiere que no se trata de un carácter muy común. Sin embargo, dada la escasez de estudios sobre la anatomía de la cápsula muscinal, por el momento es imposible valorar su importancia biológica o sistemática.

La semejanza de las células parenquimáticas de las paredes de la cápsula en todas las especies confirma los resultados obtenidos por Deguchi (1978) en este género, quien sin embargo considera este carácter de potencial interés para el diagnóstico taxonómico dentro de Grimmiaceae.

Las células que forman el eje central de la cápsula, desde su extremo proximal hasta el interior del opérculo, son continuas con la traza de hidroides de la seta y de común origen endotecial. Su posible función conductora (Héban 1977), nutritiva o como simple sostén mecánico del tejido esporógeno no ha sido investigada. En estas especies, no parecen constituir un camino preferente para la conducción de fotoasimilados, y, por poseer un protoplasto vivo, tampoco parecen especializadas en la conducción de agua (al menos en la fase del desarrollo estudiada). Quizás, en cuanto a las células centrales, su vacuolización corresponda a la hipótesis de su función sustentadora a través de la presión de turgor.

Las células preferentemente implicadas en la conducción de polisacáridos forman una banda continua que incluye el parénquima interno del tercio distal de la seta, y las células del cuello que lo unen con el tejido esporógeno (fig. 13 B). Estas últimas no muestran ninguna diferenciación morfológica aparente con respecto a las contiguas, de modo que su predominio conductor puede deberse únicamente a su situación entre la "fuente" y el "sumidero" de fotoasimilados.

La notable ausencia de acúmulos lipídicos en la cápsula, en contraste con las restantes estructuras estudiadas, puede deberse a que, por su dependencia de la generación gametofítica durante toda su vida, la brevedad de ésta y su función exclusiva de producir meyósporas, no requiere almacenamiento de sustancias de reserva para ser utilizadas a largo plazo, sino más bien compuestos de rápida degradación que permitan una pronta obtención de energía para el desarrollo y expansión de la cápsula, y para la generación y maduración de diócos.

La disposición del saco esporógeno y del tapete (fig. 13 C) concuerdan con lo descrito por Campbell (1918). La función de los polisacáridos solubles entre los esporócos (cuya presencia en musgos fue reseñada por Jensen & Hulbary 1978), se interpreta relacionada con la osmorregulación o con la formación de una red superficial en las esporas para condicionar la deposición de perina (Gambardella et al. 1994). En cuanto al tapete, las observaciones que revelan glóbulos (presumiblemente de perina) tapizando la superficie de sus células orientada hacia el tejido esporógeno se corresponden con las realizadas en distintas especies de musgos por Jarvis (1974), Müller (1974), Mogensen (1978), Brown & Lemmon (1984, 1985) y Gambardella et al. (1994). Sin embargo, no está dilucidada la naturaleza parietal o ameboidea del tapete (Pacini & Franchi 1991), dado que, aunque en la madurez de la cápsula aparezca sin integridad de paredes y desplazado hacia el exotecio (lo que sugiere que se trata de un tapete ameboideo), no se ha estudiado si este proceso de degeneración ocurre antes o después de su pérdida de funcionalidad. En este último caso, el tapete debería ser considerado como parietal, que es el tipo encontrado hasta ahora en briófitos (Gambardella et al. 1994).



Con relación al perístoma (figs. 16, 19 y 23), su fórmula y número de dientes han sido previamente descritos para Grimmiaceae (Cavers 1911, Edwards 1979). La forma, división y ornamentación ofrece suficiente variabilidad en estas especies para su diferenciación. Aparte de las reseñas, muy vagas, sobre la coloración y la presencia o ausencia de papilas, que se exponen en las descripciones generales de estas especies, tan sólo se conoce en este género el trabajo de Cao & Vitt (1986), en el que indican la forma, el grado de división y la densidad de ornamentación en diversos taxones, incluyendo tres de los aquí investigados: *Gr. decipiens*, *Gr. elatior* y *Gr. pulvinata*, y el de Deguchi (1978), entre cuyas especies sólo una, *Gr. funalis*, se incluye entre las aquí descritas. Los resultados de Cao & Vitt (1986), aun tratándose de poblaciones chinas, son casi absolutamente concordantes con los que se exponen en esta tesis, lo que podría deberse a una constancia taxonómica de estos caracteres, más que a las circunstancias ambientales. No ocurre así con las observaciones de Deguchi (1978) en *Gr. funalis* con respecto a la división longitudinal del diente, carácter que no considera constante para cada especie. En cuanto a la ornamentación, describe la densidad de papilas, pero no la presencia de otros elementos esculturales.

Cao & Vitt (1986) valoran la presencia de dientes anchos, no divididos y sólidos, como un carácter plesiotípico del perístoma. Dado que Edwards (1979) afirma, además, que el alto desarrollo de las trabéculas dorsales es un carácter típico de esta familia, se propone aquí asimismo como primitivo, mientras que el predominio de las papilas, negativamente correlacionado con el anterior, se considera apotípico. Deguchi (1978) asume las características propuestas por Philibert (1884), entre las que se incluye la ausencia de estrías verticales en Grimmiaceae y su sustitución por papilas. Los resultados aquí obtenidos muestran la abundante presencia de estrías verticales en ambas superficies del diente, al menos en algunas especies.

Sería necesario analizar si las discrepancias en cuanto a la ornamentación de *Gr. funalis* se deben a diferencias poblacionales o fenológicas, o al grado de detalle que en esta investigación permite el empleo del microscopio electrónico de barrido.

No parece existir una correspondencia absoluta en el grado de evolución de estos caracteres para cada especie. Sin embargo, se destaca *Gr. funalis*, por reunir las formas primitivas de todos ellos (aunque habría que revisar la posible tendencia del diente a dividirse, indicada por Deguchi 1978). *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla* presentan combinaciones relativamente evolucionadas de caracteres, con dominancia de papilas en la ornamentación, relativamente escasos resaltes dorsales, y tendencia al alargamiento (mayor en *Gr. trichophylla*) y a la división (mayor en *Gr. pulvinata*). Entre las restantes especies, con escasa papiliosidad, *Gr. elatior* presenta los dientes enteros, los resaltes más acusados, y el menor desarrollo de las papilas, pero en contrapartida, la forma es más evolucionada. *Gr. orbicularis* y *Gr. decipiens* presentan perístomas muy semejantes, que difieren sólo en los menores resaltes dorsales de esta última.

La homogeneidad anatómica encontrada parece indicar que se han estudiado caracteres sujetos a escasa variabilidad en estas especies en particular, o bien en el conjunto de los musgos en general, y que para lograr diferenciar estos taxones sería preciso elegir un nivel mayor de detalle. Sin embargo, faltan investigaciones previas para poder seleccionar y valorar adecuadamente estos caracteres.

## ANATOMÍA: RESULTADOS

### Zona de transición

La zona de transición se origina en el ápice del caulidio, truncando su crecimiento. En su base se produce una ramificación que continúa el crecimiento de la planta, característicamente cladocárpica.

En esta región contacta una fase esporofítica (pie) y una gametofítica (vagínula). Se reseñan a continuación las características diferenciales con las respectivas estructuras (seta y caulidio), ya comentadas:

. Aparece en ambas fases un nuevo tipo celular: las células de transferencia. Se localizan en la zona de contacto entre el esporófito y el gametófito. Estos elementos se caracterizan por poseer engrosamientos parietales de morfología muy complicada e irregular ("laberíntica"), originados a partir del estrato secundario. La organización de dicho estrato tiende a ser reticular, más laxa en estos engrosamientos. La pared primaria de las células de transferencia es difícil de distinguir por su frecuente contacto con las estructuras amorfas del espacio placentario. Sin embargo, presenta, al igual que en el caulidio y en la seta, un estrato denso, más o menos homogéneo, bordeado internamente por una banda fibrilar, menos electrondensa, que normalmente es aquí más conspicua.

. En la longitud de la vagínula no se diferencian filidios o, en todo caso, son muy reducidos o abortados. La epidermis que presenta, pues, no forma un complejo con la inserción basal de éstos. Está rodeada, al igual que el el caulidio, por una cutícula transparente a los electrones.

. La vagínula presenta un parénquima similar al del caulidio. En su zona central, el hidroma está sustituido por la presencia del pie, aunque en sus proximidades pueden diferenciarse células que asumen las características de los hidroides.

. En el pie el diámetro no es constante, en su parte apical es semejante al de la seta, y va reduciéndose hacia la base formando una punta.

. No aparece una epidermis típica de la seta: el pie carece de cutícula y su capa periférica está siempre constituida por células de transferencia. En la punta son el único tipo celular presente, hacia el ápice se desarrolla un parénquima, semejante al de la seta, salvo por la aparición ocasional de células de transferencia, y un traza de hidroides algo mayores que los de la seta.

. La estratificación de las paredes celulares en los tejidos de la vagínula y del pie es semejante a la que se observa en el caulidio y la seta.

. La actividad celular, tanto en el pie como en la vagínula, es normalmente alta en niveles basales de la zona de transición, preferentemente en los tejidos periféricos de ambas estructuras. Hacia el ápice la organización citoplasmática tiende a desaparecer, especialmente en la vagínula, que se degrada por completo, rodeando al pie o a la seta ya diferenciada con una configuración amorfa.

. En el espacio placentario que separa ambas generaciones se encuentran restos celulares, a menudo desestructurados, entre los que a veces se distingue células de transferencia degeneradas y colapsadas. En ocasiones este espacio se prolonga verticalmente en el gametófito formando un canal. Eventualmente el contacto entre el pie y la vagínula es directo en algunos puntos, sin mediar espacio placentario. En estos casos, nunca aparece plasmodiosmos comunicando ambas fases.

. El caulidio subyacente puede estar modificado por la aparición de células de transferencia cercanas al pie, o por la degradación de sus tejidos. Estas alteraciones se especificarán en cada caso.

. En cuanto a las reacciones histoquímicas, se localizan acúmulos lipídicos con cierta abundancia. La detección de almidón es fallida, con excepción de algunos oscurecimientos en el citoplasma de las células del pie, que pueden interpretarse como indicadores de la presencia de polisacáridos solubles. No se ha conseguido llevar a cabo la prueba de la celulosa, por degradarse toda la zona de transición en las concentraciones de ácido sulfúrico que se emplean. Las paredes no reaccionan con disoluciones ácidas o básicas (ocasionalmente se colorean como el caulidio), en ellas no se localizan pectinas (aunque sí, con gran intensidad, en el espacio placentario), sustancias fenólicas, ligninas ni suberinas. Sin embargo, se tiñen metacromáticamente con azul de toluidina, lo que sugiere la abundancia de grupos carboxílicos libres en las paredes.

Como base para la descripción se ha elegido el nivel más basal que presentaba ya la plena diferenciación de tejidos en el pie. Las dimensiones de las células de transferencia, hacia niveles apicales, tienden a igualarse con las dadas para las células epidérmicas de la seta.

---

*Gr. decipiens*

La zona de transición es estrechamente cilíndrica o alargadamente lageniforme, con longitud de hasta 1 mm y anchura de 150-170  $\mu\text{m}$ . El pie es aleznado, con diámetro máximo de 130-150  $\mu\text{m}$ , y penetra en el gametófito hasta un nivel situado por encima de la inserción de los filidios normalmente constituidos.

La vagínula presenta 3-4 estratos de células (fig. 24 A). La epidermis es uniestrata, con estructura de pared similar a la del caulidio, excepto en que el grosor de la pared secundaria puede disminuir a 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  en los tabiques radiales. A veces se observa diferenciación de filidios, reducidos o abortados, en la mitad basal de la vagínula.

La capa contigua a la epidermis es equivalente al parénquima del caulidio. Los estratos más internos presentan idénticas dimensiones, pero pueden verse modificados por la existencia de células de transferencia. El estrato contiguo al pie está constituido por células de transferencia, sólo ocasionalmente aparecen células de paredes no laberínticas. Los engrosamientos laberínticos están siempre presentes exclusivamente en la pared tangencial interna, que normalmente se hace convexa hacia el pie (fig. 24 A). Desde el interior, el segundo estrato posee también ocasionalmente células de transferencia, aunque nunca de forma continua. Excepcionalmente se han encontrado células de transferencia en el tercer estrato, contiguas o no las del segundo.

Los engrosamientos laberínticos de estas células son relativamente densos a los electrones, de contornos definidos, y alcanzan hasta 5-6  $\mu\text{m}$  de espesor (1-2  $\mu\text{m}$  en las no contiguas al pie). A veces se han encontrado, en células cuya posición correspondería a la de las células de transferencia, estructuras fibrosas discontinuas, dispersas en el lumen cercano a la pared, posiblemente correspondientes a antiguos engrosamientos laberínticos degradados.

No se han observado campos de punteaduras primarias, aunque sí plasmodesmos, más abundantemente en la epidermis.

En la mitad basal de la vagínula se encuentran abundantes lípidos, plastos, núcleo, etc., especialmente en la epidermis. En estratos interiores el citoplasma aparece altamente vacuolizado y degradado, aunque a menudo se conserva todavía el núcleo y el nucléolo. La pared de estas células tiende a reducirse y desestructurarse.

En niveles superiores desaparece la actividad celular, se desorganizan las paredes y se encuentran abundantes microorganismos en los tejidos de la vagínula.

El espacio placentario aparece bastante compacto. Ocasionalmente se prolonga como un canal hacia el interior del gametófito (fig. 24 A).

En el caulidio subyacente, las células en contacto con la punta del pie diferencian engrosamientos laberínticos, así como las que flanquean, en su caso, la prolongación del espacio placentario. Aparecen a menudo células con posibles engrosamientos laberínticos degenerados. En distintos especímenes se han observado células con contenido citoplasmático, células vacías y degradadas (normalmente presentan acúmulos lipídicos), o tejidos con ambos tipos de células. En el caso de estar degradadas, el aspecto de sus paredes es semejante al de la pared de los hidroides, aunque difieren por no ser oblicuas, así como por el mayor diámetro del lumen. Estas células no contactan nunca con la traza de hidroides del gametófito, que se desvía hacia la ramificación que marca la cladocarpia en un nivel mucho más basal que el del inicio de la zona de transición. Sin embargo, son contiguas al parénquima conductor, con abundantes campos de punteaduras primarias, presente en el ápice del gametófito.

Con respecto al pie, está constituido exclusivamente por células de transferencia (fig. 24 A), aparentemente en un solo estrato, en su punta, al menos en tres o cuatro alturas de células.



En las secciones con tejidos ya diferenciados se observan tres estratos periféricos de células vivas. El externo consta siempre de células de transferencia. El contiguo puede estar formado por células parenquimáticas o de transferencia. El interno sólo posee células parenquimáticas. Las células de transferencia miden cerca de 40  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, 20-25  $\mu\text{m}$  en la radial y 10-20  $\mu\text{m}$  en la tangencial. Los engrosamientos laberínticos son de contornos algo difusos, medianamente densos a los electrones, de estructura muy laxamente reticulada, y se presentan sólo en las paredes tangenciales externas, que se hacen convexas. Pueden medir 6-8  $\mu\text{m}$  de grosor en el estrato externo, en el segundo se reducen a 1,5  $\mu\text{m}$ .

La actividad celular de estos tejidos es alta en la epidermis, que presenta un citoplasma con plastos no pleomórficos, abundantes mitocondrias, retículo endoplasmático, figuras mielínicas, etc. En los otros estratos existe un cierto grado de vacuolización, guirnalda concéntrica de retículo endoplasmático y algunos orgánulos degenerados. Se observan plasmodesmos atravesando las paredes no laberínticas de estas células, aunque nunca se agrupan en campos de punteaduras primarias.

La traza central es un hidroma semejante al de la seta, salvo en el diámetro del lumen, algo mayor (15-20  $\mu\text{m}$  en sección transversal). A menudo se encuentra altamente degradado, constituyendo una laguna central. Las células periféricas aparecen con las paredes más enteras, manteniéndose incluso la estructura de la pared primaria en el contacto con el parénquima.

*Gr. elatior*

La zona de transición es cilíndrica, de 1 mm de longitud por 200-220  $\mu\text{m}$  de anchura. El pie tiene un diámetro máximo de cerca de 150  $\mu\text{m}$ , y en corte longitudinal tiene forma de lengüeta. Penetra en el caulidio hasta el nivel de inserción de los filidios normalmente constituidos.

La vagínula presenta 6-10 estratos de células (figs. 24 B, 25 B). La epidermis es bi- o triestrata, y a veces diferencia, en su mitad basal, filidios reducidos o abortados. Sus células son semejantes a las del caulidio, con mayor tendencia a alargarse tangencialmente. La estructura de su pared primaria es semejante a la de la epidermis del caulidio, en cambio, la secundaria, ocasionalmente, puede engrosarse hasta casi colapsar el lumen, forma bandas diferenciadas y el estrato más interno puede aparecer desorganizado, con una morfología muy variable, que casi lo asemeja a un engrosamiento laberíntico.

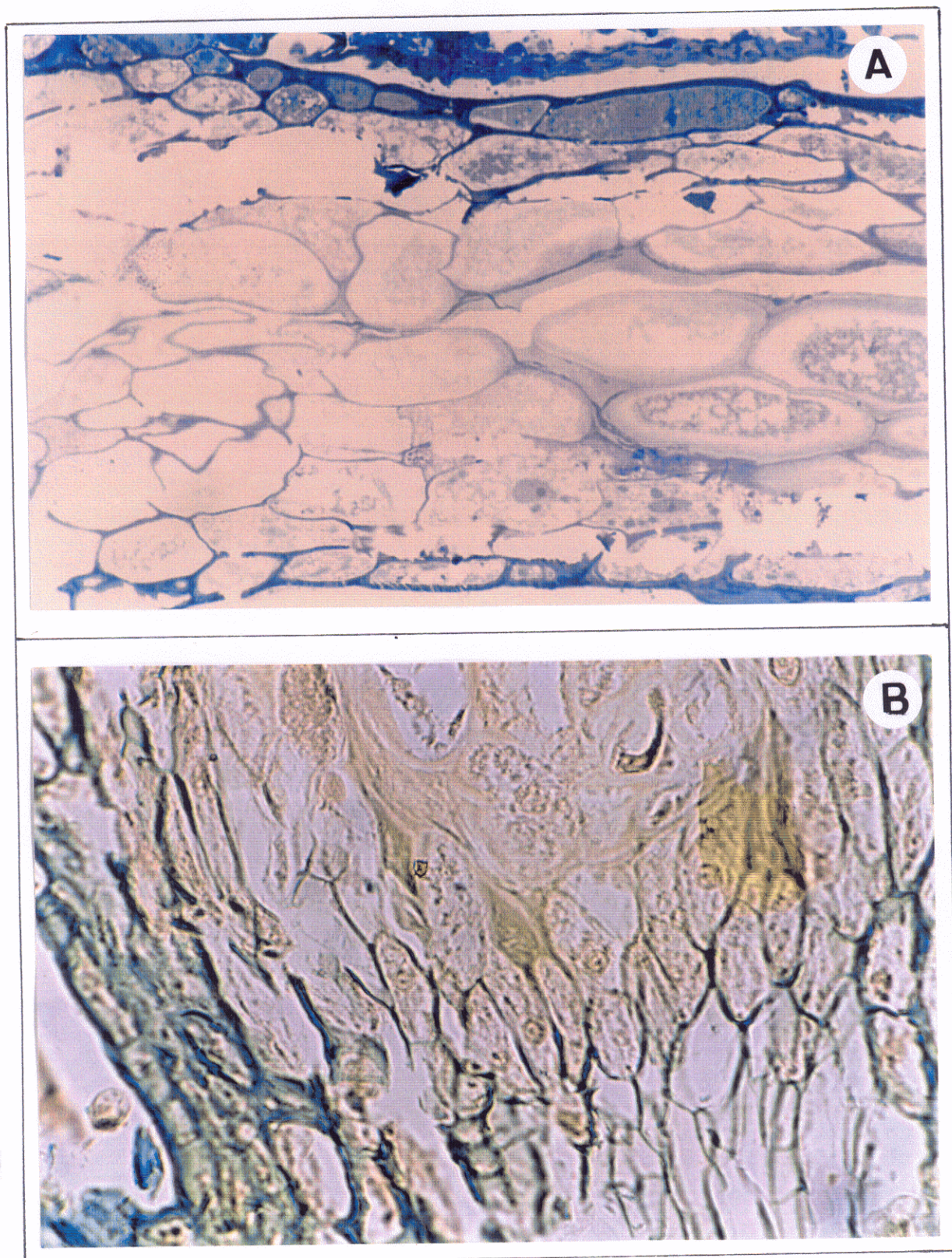
Las capas contiguas (4-5) muestran unas veces características de células parenquimáticas normales, y otras, presentan una fuerte degradación de sus paredes, similar a la de los hidroides (fig. 25 B). Tienden a ser, en sección transversal, menores que las del caulidio. La pared secundaria, al igual que en éstos, presenta un aspecto muy laxamente fibrilar y escasa densidad electrónica y grosor, en tanto que la primaria suele estar mejor conservada (fig. 25 A).

---

**Fig. 24. A:** Corte longitudinal de la zona de transición de *Gr. decipiens*, punta del pie esporofítico, teñido con azul de metileno, 600 $\times$ . **B:** Corte longitudinal de la zona de transición de *Gr. elatior*, punta del pie esporofítico, teñido con verde de metilo y rojo Congo, 600 $\times$ .

---







El estrato más interno está constituido por células de transferencia, que ocasionalmente se presentan también, de forma no continua, en el segundo estrato, e incluso en el tercero. Los engrosamientos laberínticos son de contornos definidos, más opacos a los electrones que el resto de la pared secundaria y alcanzan 2-3  $\mu\text{m}$ , independientemente de su posición. Están presentes exclusivamente en las paredes tangenciales internas, que suelen ser convexas. Se han observado asimismo células en el estrato más interno carentes de engrosamientos laberínticos, pero con abundantes restos fibrosos cerca de la pared, posiblemente restos degradados de esta modificación.

Se encuentran frecuentes plasmodesmos, especialmente en las paredes transversales, pero nunca se agrupan en campos de punteaduras primarias.

En el ápice, la vagínula se degrada formando una masa amorfa, con abundantes microorganismos, circundando la seta.

No se ha observado actividad celular en toda su longitud. Todos estos tejidos presentaban un gran número de microorganismos en su interior (fig. 25 B).

En el espacio placentario se distinguen restos celulares semejantes a las células de paredes degradadas del parénquima interno. No se ha registrado la prolongación de este espacio hacia el caulidio.

En el caulidio subyacente, las células en contacto con la punta del pie presentan engrosamientos laberínticos, o estructuras fibrilares que presumiblemente proceden de su degradación. En distintos especímenes se han observado células vecinas degradadas o vivas, aunque siempre muestran paredes finas (fig. 24 B). Se remarca que tienden a presentar células degradadas los ejemplares más maduros, y que estas células son continuas con la traza de hidroides del caulidio. Sus paredes no son oblicuas, aunque por lo demás presentan la misma estructura que los hidroides. El parénquima conductor del caulidio se prolonga hasta el nivel de aparición de estas células.



En el pie, la punta, de una o dos alturas de células, está formada exclusivamente por células de transferencia (fig. 24 B). En las secciones en que se diferencian todos los tejidos, se distingue una capa epidérmica, constituida por células de transferencia de 50-60  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, 20-30  $\mu\text{m}$  en la radial y 10-20  $\mu\text{m}$  en la tangencial. Los engrosamientos laberínticos son de contornos poco definidos, de organización reticular muy laxa, y de un espesor de hasta 5  $\mu\text{m}$ , y aparecen sólo en las paredes tangenciales externas, que se hacen convexas hacia el espacio placentario.

La capa parenquimática contigua, semejante a la de la seta, consta de tres estratos, de los que sólo el externo presenta muy ocasionalmente células de transferencia.

El hidroma es similar al de la seta, con mayor tendencia a conservar la pared primaria, especialmente en su periferia.

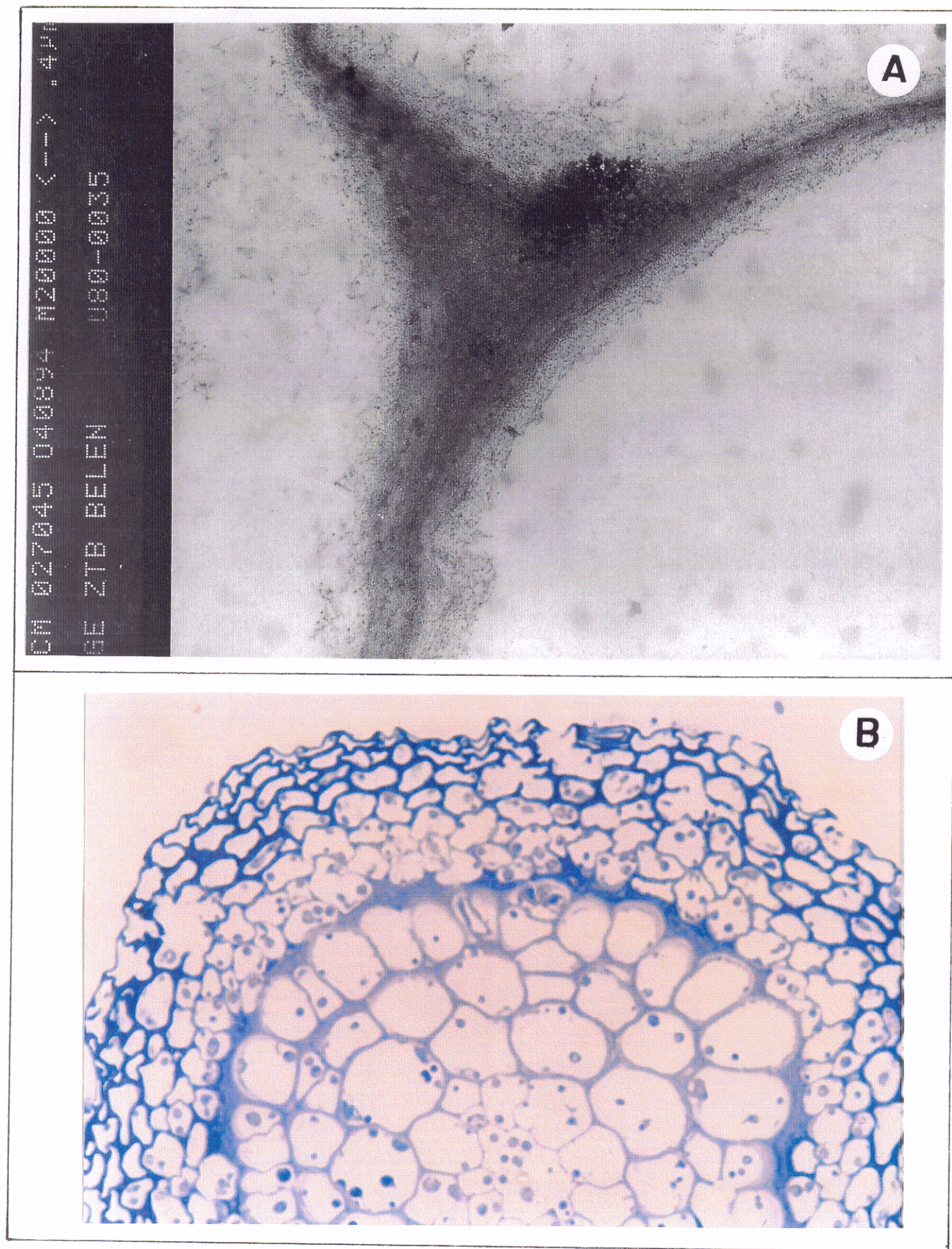
No se ha registrado organización citoplasmática, sin embargo se han observado abundantes microorganismos, preferentemente en la zona central.

---

**Fig. 25. A:** Corte transversal de la zona de transición de *Gr. elatior*, trigono de células internas de la vaginula, a MET. **B:** Corte transversal de la zona de transición de *Gr. elatior*, teñido con azul de metileno, 600x.

---









*Gr. funalis*

La zona de transición es cilíndrica o doliiforme, con longitud de 500  $\mu\text{m}$  y diámetro máximo de 200-220  $\mu\text{m}$ . El pie tiene forma de lengüeta en corte longitudinal, con un diámetro máximo de 100-120  $\mu\text{m}$ . Penetra hasta un poco por encima de los primeros filidios normalmente constituidos.

La vagínula presenta 6-10 estratos de células, de los que los dos o tres periféricos corresponden a la epidermis. El estrato más interno está formado por células de transferencia, que ocasionalmente presentan paredes laberínticas degradadas o no desarrolladas. Los dos estratos contiguos muestran también algunas células de transferencia, aunque no de forma continua.

Los engrosamientos laberínticos son de contornos definidos, densos a los electrones y de aspecto reticular (fig. 26 A). Alcanzan hasta 5  $\mu\text{m}$  de grosor y se encuentran siempre en las paredes tangenciales internas, que se hacen convexas hacia el espacio placentario. Los tres estratos mas internos muestran alta degradación de sus paredes celulares, asemejándose a los hidroides incluso en la inclinación de la pared transversal (aunque no son tan alargadas). En ocasiones se diferencian restos de pared secundaria aun no desestructurada.

Se han observado algunos plasmodesmos aislados, especialmente en la periferia.

La actividad celular en la vagínula es escasa. Se observa una alta vacuolización en las células epidérmicas, donde frecuentemente aparece el núcleo con un nucléolo bien desarrollado. Las células más internas se presentan vacías.

El espacio placentario tiene un aspecto denso, aunque se distinguen restos de engrosamientos laberínticos correspondientes a células colapsadas. En ocasiones se prolonga formando un canal en la parte central del caulidio.

Las células subyacentes al pie desarrollan engrosamientos laberínticos en el contacto con la punta de éste y, en su caso, con la prolongación del espacio placentario. Muestran una alta degradación de la organización citoplasmática y de la pared, que llega a tener el aspecto de la de los hidroides (fig. 26 B). Los especímenes más jóvenes presentan un mayor número de células vivas en esta posición. Los mencionados tipos celulares entran en contacto con la traza de hidroides del caulidio. El parénquima conductor del ápice de éste llega hasta su nivel.

El pie consta exclusivamente de células de transferencia en 1-2 alturas de células desde su punta (fig. 26 B). En el nivel en el que se diferencian todos los tejidos, se observan tres estratos de células vivas. El periférico está formado por células de transferencia de 50-60  $\mu\text{m}$  de dimensión longitudinal, y 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro en sección transversal, aunque tienden a alargarse radialmente. Los engrosamientos laberínticos poseen contornos poco definidos y una estructura muy laxa (fig. 26 A). Alcanzan un grosor de cerca de 3  $\mu\text{m}$ , y se disponen siempre en las paredes tangenciales externas, que se hacen convexas hacia el espacio placentario. Los otros estratos están formados preferentemente por células parenquimáticas, aunque el contiguo a la epidermis presenta irregularmente células de transferencia, con escaso desarrollo de las paredes laberínticas.

Estas células aparecen bastante vacuolizadas, con restos de orgánulos en degeneración y figuras mielínicas. Frecuentemente se observa, sin embargo, el núcleo y el nucléolo, especialmente en las periféricas. Las paredes no laberínticas muestran ocasionales perforaciones plasmodesmáticas.

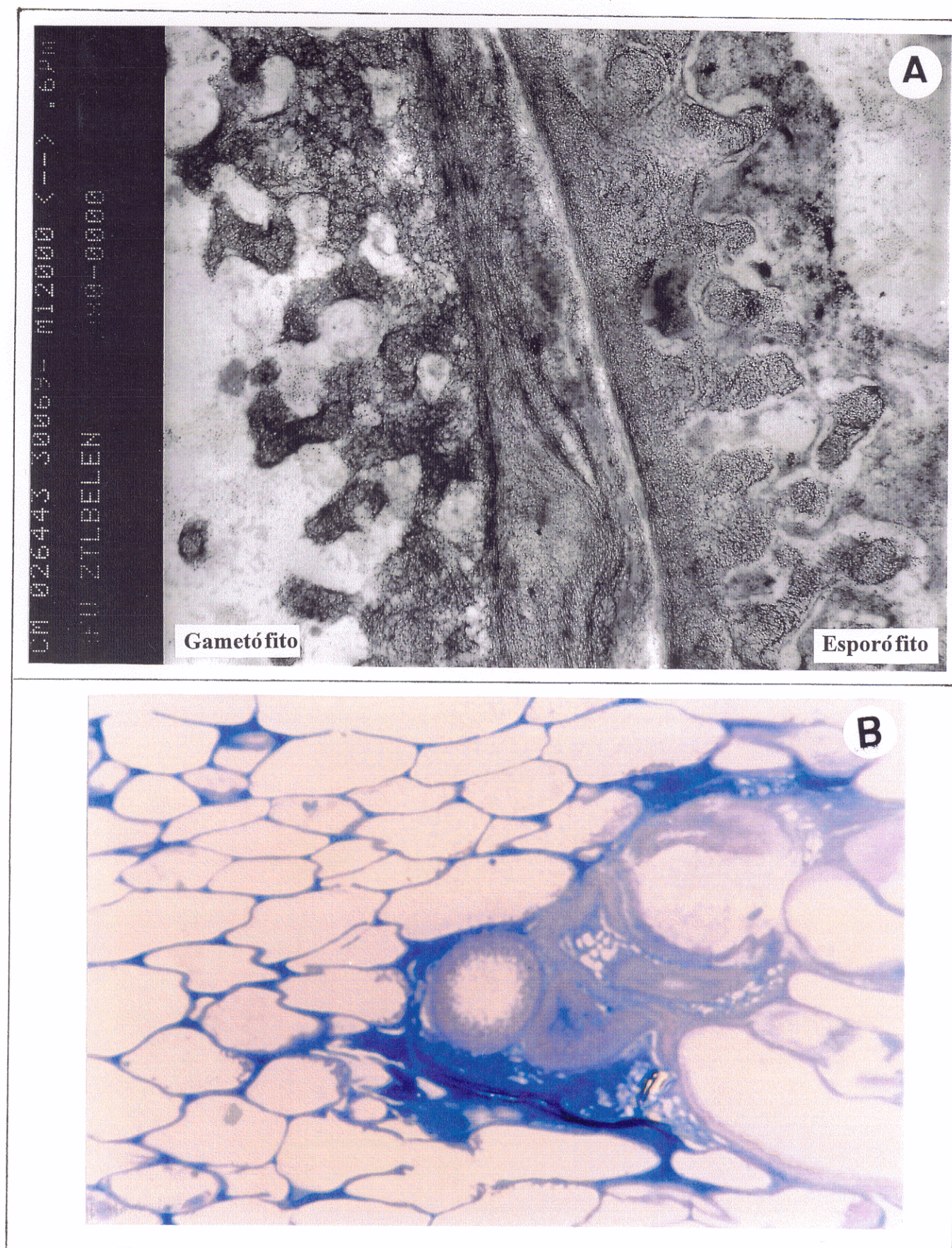
El hidroma del pie consta de escasas células (en ocasiones 1 ó 2), con pared primaria bastante íntegra en su estructura.

---

**Fig. 26. A:** Corte longitudinal de la zona de transición de *Gr. funalis*, engrosamientos laberínticos de las células de transferencia a ambos lados de la placenta, a MET. **B:** Corte longitudinal de la zona de transición de *Gr. funalis* (punta del pie esporofítico) teñido con azul de metileno, 850 $\times$ .

---









*Gr. orbicularis*

La zona de transición es alargadamente lageniforme, de aproximadamente 800  $\mu\text{m}$  de longitud y 175-200  $\mu\text{m}$  de anchura. El pie tiene forma de lengüeta en corte longitudinal, y 150-170  $\mu\text{m}$  de diámetro máximo. Penetra hasta el nivel de inserción de los filidios normalmente constituidos (fig. 27 B).

La vagínula comprende 3-4 estratos. La epidermis, relativamente individualizada por su pared más gruesa, es uniestrata, sin que se hayan visto filidios abortados o reducidos diferenciándose de ella. El estrato más interno está formado por células de transferencia, con engrosamientos laberínticos de hasta 2-3  $\mu\text{m}$  de espesor, de contornos definidos, densos a los electrones, y situados en la pared tangencial interna, convexa hacia el esporófito (fig. 27 A). El resto de los estratos consta de células parenquimáticas y sólo muy ocasionalmente aparecen células de transferencia. Muestran una tendencia al adelgazamiento de su pared, que llega al extremo a asemejarse en su estructura a la de los hidroides (fig. 27 B). Se aprecian escasos plasmodesmos, situados preferentemente en la epidermis.

La actividad celular se reduce a la mitad basal, especialmente en las células epidérmicas, aunque son abundantes los signos de degradación. Se destaca la observación de microorganismos (probablemente bacterias) en el interior del citoplasma, aún no del todo degenerado, de una célula parenquimática, sin que las adyacentes se vieran afectadas (fig. 30 A). La mitad apical está completamente degenerada y reducida a una vaina que circunda la seta.

El espacio placentario muestra restos de antiguas células de transferencia colapsadas, y ocasionalmente se prolonga hacia el caulidio formando un estrecho canal.

El caulidio subyacente presenta células de transferencia en contacto con la punta del pie, y, en su caso, con la prolongación del espacio placentario. Tanto ellas como las células vecinas muestran alta tendencia a la degradación de sus paredes y citoplasmas, ofreciendo a menudo un aspecto similar al de los hidroides (fig. 27 B). El estudio de especímenes más jóvenes muestra actividad vital en estas células, así como la retención mayor del núcleo y del nucléolo. Esta región contacta con el hidroma y con el parénquima conductor del caulidio.

El pie posee 1-4 alturas de células de transferencia en su punta. En niveles completamente diferenciados, se aprecian tres estratos de células vivas. Las epidérmicas presentan engrosamientos laberínticos, y miden 40-60  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, 20-30  $\mu\text{m}$  en la radial y 15-20  $\mu\text{m}$  en la tangencial. La pared laberíntica presenta un grosor de hasta 3  $\mu\text{m}$ , es densa a los electrones, de organización reticulada y sus contornos están bien definidos. Esta especialización aparece en la cara tangencial externa, que se hace convexa hacia la vagínula. El estrato contiguo presenta frecuentes células de transferencia, aunque no de forma continua, y sus engrosamientos laberínticos son menos desarrollados, muchas veces no polarizados, y no producen convexidad en la pared. La capa más interna es exclusivamente parenquimática (fig. 27 A).

Se observan frecuentes plasmodesmos entre las paredes radiales. La organización citoplasmática es alta en las células de transferencia epidérmicas, que presentan cloroplastos pleomórficos (en corte transversal aparecen a menudo con una cavidad central, que probablemente corresponde a una invaginación), numerosas mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas, núcleo con nucléolo desarrollado y vacuolas de pequeño tamaño. Los estratos internos presentan signos de degradación (mayor vacuolización, figuras mielínicas, etc.). La capa interna consta frecuentemente de células vacías.

El hidroma del pie está formado por 2-3 células, que conservan la estructura de su pared primaria (fig. 27 A).

---

**Fig. 27. A:** Corte transversal de la zona de transición de *Gr. orbicularis*, panorámica, a MET. **B:** Corte longitudinal de la zona de transición de *Gr. orbicularis*, teñido con azul de metileno, 220 $\times$ .

---









***Gr. pulvinata***

La zona de transición es alargadamente lageniforme, de aproximadamente 600  $\mu\text{m}$  de longitud y 200-220  $\mu\text{m}$  de anchura. El pie, en corte longitudinal, tiene forma de lengüeta con la punta bastante ancha, y su diámetro máximo es de 120-140  $\mu\text{m}$ . Penetra hasta el nivel de inserción de los filidios normalmente constituidos.

La vagínula consta de 3-4 estratos, con una epidermis uniestrata (fig. 28 B) de la que ocasionalmente, en la mitad basal, se diferencian filidios abortados o reducidos.

La capa interna está formada por células de transferencia, con engrosamientos de organización laxa, contornos poco definidos, y espesor de hasta 3  $\mu\text{m}$ , que se dispone en las paredes tangenciales internas, que se hacen convexas hacia el pie. Ocasionalmente aparecen células de transferencia en el segundo o en el tercer estrato, con engrosamientos menos desarrollados, pero igualmente polarizados. Las células de estos estratos internos están altamente vacuolizadas, y la pared tiende a degradarse y a colapsar, aunque normalmente se observan restos de pared secundaria no desestructurada. La epidermis suele retener mayor organización citoplasmática, y presenta más frecuentemente plasmodesmos aislados.

El espacio placentario se muestra con un aspecto homogéneo, aunque ocasionalmente se reconocen restos de paredes de células de transferencia. En algunos puntos es muy reducido, o desaparece, produciéndose un contacto directo entre las fases esporofítica y gametofítica. En los especímenes estudiados no se ha observado su prolongación hacia el caulidio, pero es frecuente que un material de aspecto similar al que rellena el espacio placentario ocupe paredes y lúmenes de células subyacentes (fig. 28 C).

Las células del caulidio en contacto con la punta del pie diferencian engrosamientos laberínticos, en ocasiones degenerados. Las vecinas muestran desorganización citoplasmática, y un adelgazamiento de la pared, aunque suelen mantener, al menos parcialmente, la estructura del estrato secundario. En especímenes algo más jóvenes, estas células pueden aparecer vivas. Esta región establece contacto con la traza de hidroides del caulidio. El parénquima conductor se diferencia hasta su nivel (fig. 28 C).

La punta del pie consta exclusivamente de células de transferencia en 2-3 alturas. En niveles que muestran la mayor diferenciación de tejidos, aparecen cuatro estratos de células vivas. El más externo está formado por células de transferencia de cerca de 50  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, 30-40 en la radial y 15-20 en la tangencial, con engrosamientos laberínticos de contornos bien definidos, organización laxa, relativamente densos a los electrones, polarizados en las paredes tangenciales externas (que se hacen convexas hacia la vagínula), y que alcanzan un grosor de 2-3  $\mu\text{m}$  (fig. 28 A). El estrato contiguo presenta irregularmente células de transferencia, con engrosamientos menos desarrollados, de cerca de 1  $\mu\text{m}$  de grosor, igualmente polarizados.

Se registra una alta organización citoplasmática en las células de transferencia epidérmicas, con plastos no pleomórficos, de pequeño tamaño (0,5-1  $\mu\text{m}$ ), numerosas mitocondrias, retículo endoplasmático, núcleo, vacuolas pequeñas, etc. (fig. 28 A). Hacia el interior, las células presentan un mayor grado de vacuolización, guirnalda concéntrica de retículo endoplasmático y orgánulos degenerados, y es frecuente que el estrato más interno se componga de células vacías.

El hidroma consta de 6-10 células, cuya pared puede degradarse tanto que la traza llega a aparecer como una laguna central.

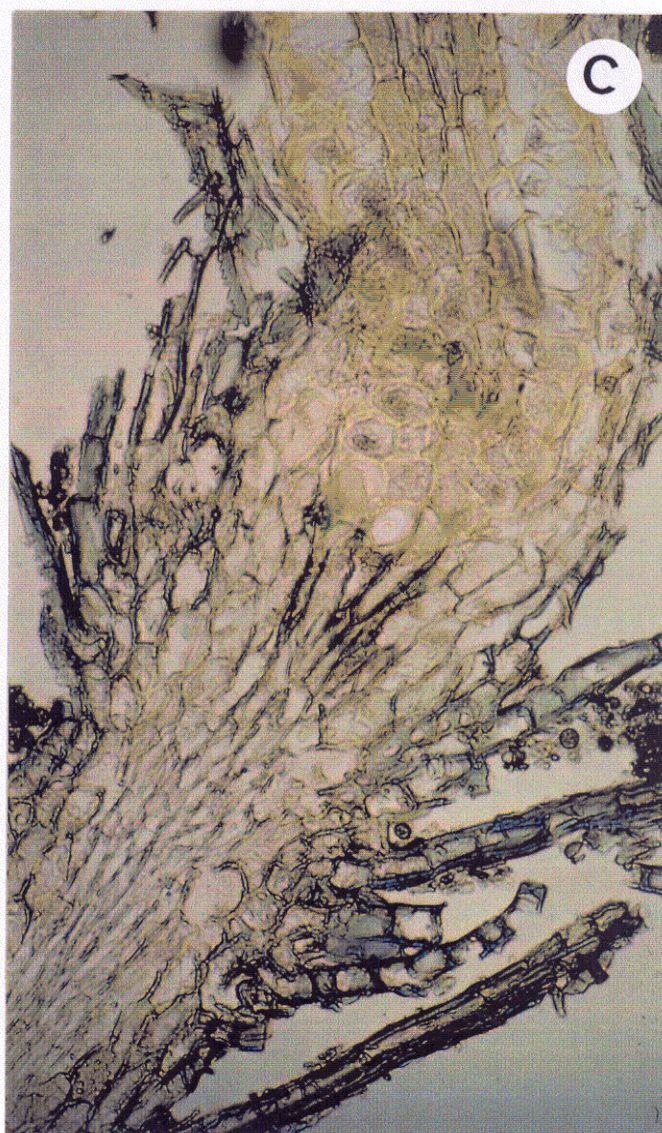
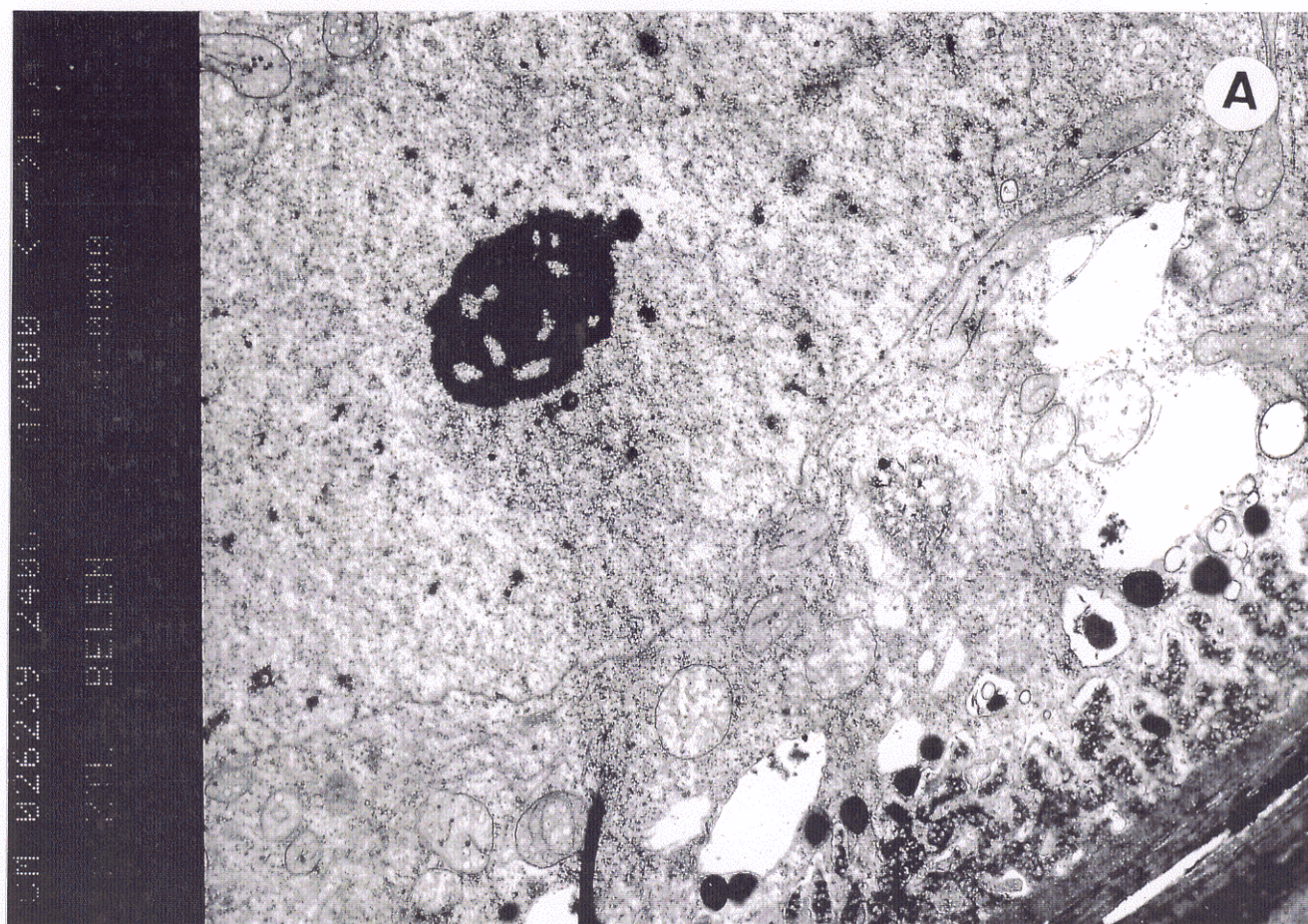
Se destaca la presencia de cristales aciculares bordeando las paredes de las células centrales del pie.

---

Fig. 28. A: Corte transversal de la zona de transición de *Gr. pulvinata*, célula de transferencia esporofítica, a MET. B: Corte transversal de la zona de transición de *Gr. pulvinata*, teñido con verde de metilo y rojo Congo, 850 $\times$ . C: Corte longitudinal de zona de transición de *Gr. pulvinata*, teñido con verde de metilo y rojo Congo, 500 $\times$ .

---











*Gr. trichophylla*

La zona de transición es lageniforme, con una longitud aproximada de 600  $\mu\text{m}$  y una anchura de 150-175  $\mu\text{m}$ . El pie tiene una forma cónica, con un diámetro máximo de 100-120  $\mu\text{m}$ , y penetra hasta un poco por encima del nivel de los filidios normalmente constituidos.

La vagínula se compone de 3-4 estratos (fig. 29 B), de los que uno o dos constituyen la epidermis. No se observan filidios abortados o reducidos diferenciándose de ella. Todas las células tienden a colapsar. El estrato más interno consta de células de transferencia, con engrosamientos laberínticos laxos, de contornos definidos, con un espesor de hasta 3  $\mu\text{m}$ , polarizados en la pared tangencial interna, que tiende a hacerse convexa hacia el pie. En ocasiones se observa un material obliterando estos laberintos. Los dos estratos contiguos pueden presentar también células de transferencia, aunque de manera irregular. Especialmente en los estratos internos, las paredes aparecen degeneradas, asemejándose a las de los hidroides. El citoplasma aparece degradado, aunque aún se distinguen algunos orgánulos.

El espacio placentario se observa relleno de restos celulares. En ocasiones desaparece, produciéndose un contacto directo entre el pie y la vagínula. En las muestras estudiadas no se ha observado su prolongación hacia el caulidio.

La células del caulidio subyacentes al pie presentan típicas células de transferencia, o bien con estructuras fibrosas atribuibles a engrosamientos laberínticos degradados. Tanto ellas como las vecinas muestran una pared degenerada, similar a la de los hidroides. A menudo las paredes transversales son oblicuas, y el citoplasma aparece altamente desorganizado. Contactan con la traza de hidroides del caulidio, y hasta su nivel se diferencia el parénquima conductor subyacente (fig. 29 B).

La punta del pie está constituida exclusivamente por células de transferencia en 2-3 alturas. En niveles que muestran toda la diversidad de tejidos, aparecen tres estratos de células vivas. Las epidérmicas, de 40-60  $\mu\text{m}$  en su dimensión longitudinal, 20-30  $\mu\text{m}$  en la radial y 15-25  $\mu\text{m}$  en la tangencial, son células de transferencia con paredes tangenciales externas convexas hacia el espacio placentario, laberínticas, de hasta 3-5  $\mu\text{m}$  de grosor, de contornos definidos, de organización reticular. El estrato contiguo desarrolla frecuentemente células de transferencia, con engrosamientos laberínticos menos desarrollados (hasta 2  $\mu\text{m}$ ). La interna presenta tan sólo células parenquimáticas.

Las células de transferencia epidérmicas muestran una alta organización citoplasmática, con cloroplastos pleomórficos, de sección alantoidea con los extremos ensanchados, mitocondrias, sistemas de membrana, etc. (fig. 29 A). Hacia el interior aparecen signos de degradación: vacuolización, guirnaldas concéntricas de retículo endoplasmático, etc. Es frecuente que la capa más interna se componga de células vacías.

El hidroma consta de pocas células (3-6), con la pared primaria relativamente estructurada, aunque en ocasiones se ha encontrado sólo una laguna central.

---

**Fig. 29. A:** Corte transversal de la zona de transición de *Gr. trichophylla*, célula de transferencia esporofítica (segunda capa), a MET. **B:** Corte longitudinal de la zona de transición de *Gr. trichophylla* (punta del pie esporofítico), teñido con azul de metileno, 600 $\times$ .

**Fig. 30. A:** Microorganismos (bacterias) en células de la vagínula de *Gr. orbicularis*, a MET. **B:** Microorganismos eucariotas en corte transversal de seta de *Gr. elatior*, a MET.

---



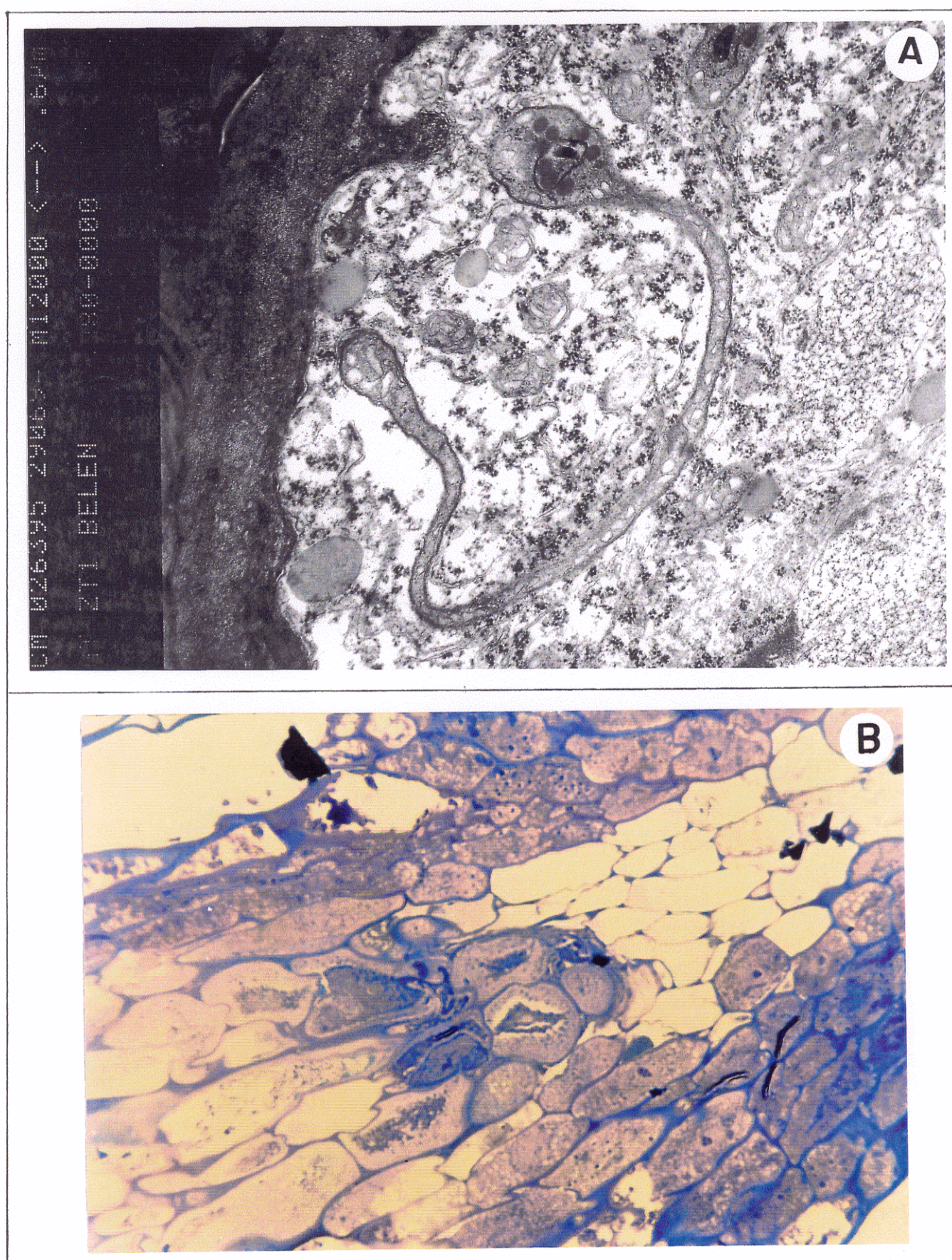
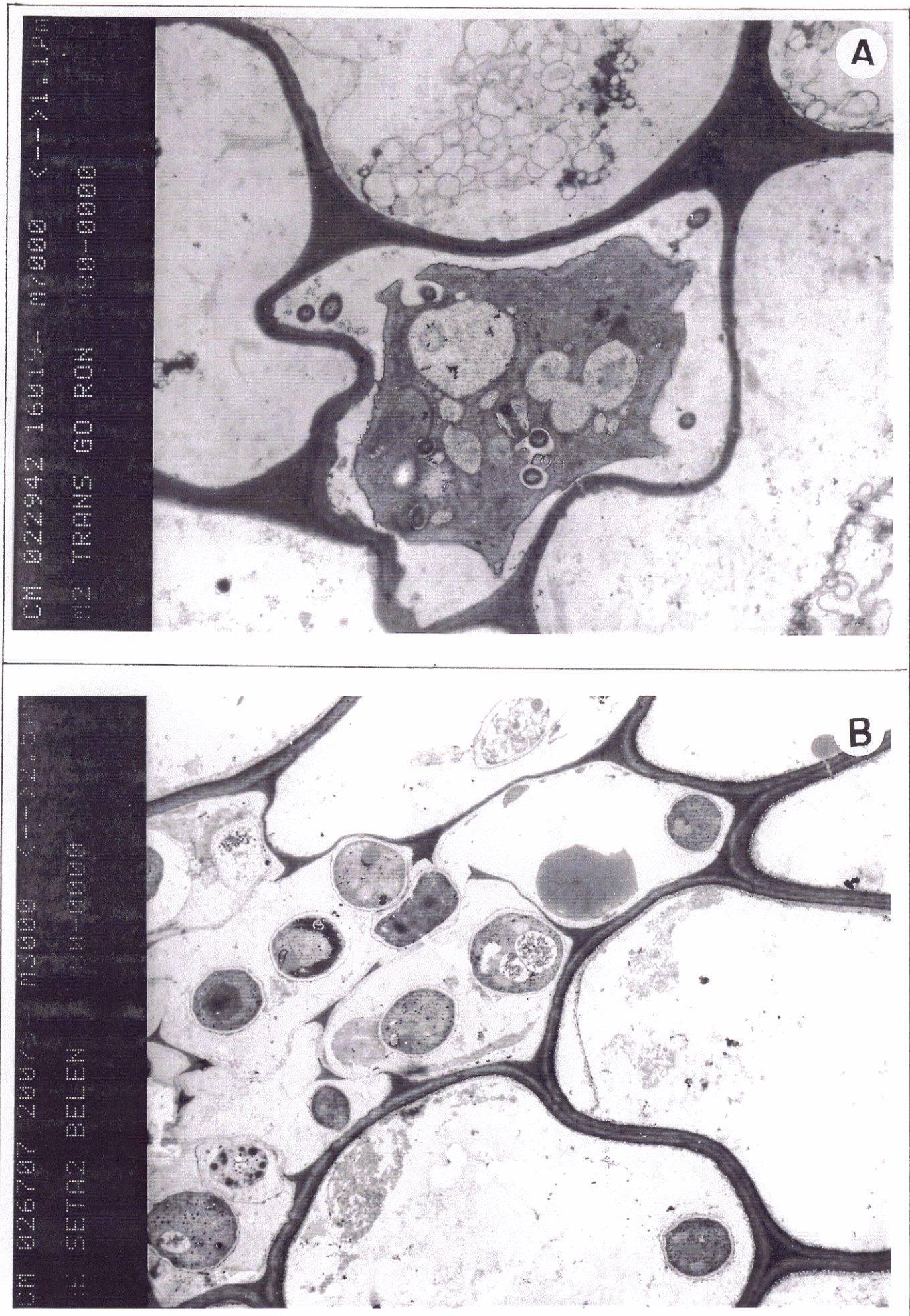








Fig. 30





## ANATOMÍA: DISCUSIÓN

### Zona de transición

La estructura de las zonas de transición es considerada por Ligrone & Gambardella (1988b) como importante en la filogenia de la división Bryophyta, para valorar si las diferencias entre ellas, y en consecuencia las diferencias del contacto entre gametófito y esporófito, pueden corresponder a evoluciones paralelas en los distintos grupos.

A pesar de la escasez de datos, (se conocen menos de 20 estudios sobre placentas en el total aproximado de 25.000 especies de briófitos) y ninguno sobre las especies aquí tratadas, especialmente sobre ultraestructura, estos autores intentan, basándose en observaciones de trabajos anteriores, establecer una correlación muy general entre los patrones de disposición de las células de transferencia y los grandes grupos de briófitos

\* En Sphagnidae no se observa la presencia de estas células (a diferencia de todos los demás grupos de briófitos).

\* En *Tetraphis pellucida* y *Andreaea rupestris* (Roth 1969), así como en *Buxbaumia piperi* (Ligrone et al. 1982b) se ha encontrado una sola capa de células de transferencia esporofíticas, y, por contra, varias capas gametofíticas; tal como está descrito en Marchantiopsida (Kelley 1969, Gambardella & de Lucia Sposito 1981, 1982, 1983; Ligrone & Gambardella 1988b).



\* En Anthocerotopsida existen varias capas gametofíticas de células de transferencia, que faltan por completo en el lado esporofítico de la placenta (Chauhan & Schraudolf 1986, Gambardella et al. 1981, Ligrone & Renzaglia 1990, Renzaglia 1978).

\* En Polytrichales (Roth 1969, Héban 1975), se ha observado la situación inversa, es decir, varias capas esporofíticas de células de transferencia y ausencia de las mismas en la placenta vaginular.

\* En el resto de Bryidae parece encontrarse una sola capa de células de transferencia a cada lado de la placenta en los casos hasta ahora descritos: Lorch (1925a,b); Blaikley (1933) -estudios no ultraestructurales-; Ligrone & Gambardella (1988b).

Las observaciones registradas en seis de las diez especies objeto de esta tesis muestran un patrón de dos estratos de células de transferencia en el pie esporofítico, enfrentadas a 1-3 estratos en la vaginula gametofítica, lo que supone un patrón diferente a los anteriores, y que confirma para estas especies los resultados preliminares obtenidos en *Gr. orbicularis* (Estébanez 1991).

Por un lado, la presencia de más de una capa de células de transferencia esporofíticas aproximaría estos taxones a Polytrichales, mientras que la existencia de varias capas en el gametófito los asemejaría a Marchantiopsida o a *Buxbaumia*, único género de musgos con este patrón.

La improbable cercanía de estos grupos sugiere más bien la inestabilidad de este carácter. De hecho, en las especies de *Grimmia* analizadas, aunque la presencia de células de transferencia no placentarias en ambas fases no es un hecho accidental, tampoco forman normalmente estratos continuos. Además, se conoce la capacidad de estas células de desarrollar engrosamientos laberínticos en función de las condiciones ambientales, en concreto, de la presencia de azúcares en el medio (Maier & Maier 1972). Una inducción no correspondiente a un patrón predefinido parece ser la aquí encontrada en las células del gametófito subyacente a la zona de transición, que establecen contacto no con el esporófito, sino con la prolongación del espacio placentario (cuya presencia parece ocasional en las distintas especies estudiadas).

Por ello, se considera que este carácter no es reflejo de grandes eventos acaecidos en la estrategia de vida del esporófito, marcadores en el curso de la evolución de la divergencia entre los grandes grupos de briófitos. Posiblemente corresponda a una respuesta más inmediata a condiciones ambientales, tal vez influida por caracteres de base taxonómica (tamaño de las células, longitud del recorrido del agua y nutrientes transferidos hacia la cápsula -longitud de la seta-, etc.), como además parece indicar la constancia del patrón en las seis especies estudiadas, pero también posiblemente por circunstancias ecológicas. Por ejemplo, un aumento de la concentración de azúcares (probablemente capaz de inducir la formación de engrosamientos laberínticos) se ha descrito como un mecanismo de defensa ante condiciones xéricas, contribuyendo, mediante la elevación del potencial osmótico, a la retención de agua (Bewley 1979). Se subraya que el género *Grimmia*, según es sabido, es típicamente xerofítico.

El estudio de la configuración placentaria de otros briófitos, así como de su relación con condiciones ambientales, puede ayudar a resolver esta cuestión.

Por otro lado, Ligrone & Gambardella (1988a,b) consideran una relación entre la penetración del pie esporofítico en el caulidio hasta la traza vascular con la presencia de una punta necrosada en el extremo de aquél, permitiendo así un contacto apoplástico entre los hidromas de ambas generaciones.

Esto se ha descrito en musgos acrocárpicos de anatomía relativamente compleja: *Bryum capillare* (Roth 1969), *Funaria hygrometrica* (Wiencke & Schulz 1975, 1978; Browning & Gunning 1979) y diversas especies de Polytrichales (Roth 1969, Hébant 1975). Sin embargo, la punta necrosada no remata el pie del esporófito de las especies en que éste penetra escasamente, como en *Diphyscium foliosum* (Blaikley 1933), en *Physcomitrium cyathicarpum* (Chauhan & Lal 1984), en *Buxbaumia piperi* (Ligrone & Gambardella 1982b) y en los pleurocárpicos *Isopterygium pulchellum* y *Brachythecium velutinum* (Roth 1969).

Ligrone & Gambardella (1988a,b) señalan *Timmiella barbulooides* como excepción de la regla propuesta, al contactar con los hidroides sin presentar punta necrosada (Ligrone et al. 1982a).

Los resultados obtenidos en *Grimmia* no muestran en ningún caso la existencia de necrosis en las células de la punta del pie. Aun en el caso de degenerar el citoplasma, las paredes permanecen íntegras. Esto concuerda con que la penetración no supera el límite de inserción de filidios normalmente constituidos, aunque sí el de otros abortados.

En cuanto al contacto con la traza de hidroides, se subraya el hecho de que en todas las especies tratadas aquí, la presencia del pie, a partir de un determinado grado de maduración esporofítica, parece inducir la degeneración citoplasmática y parietal de las células gametofíticas circundantes, que se vuelven similares a hidroides. La tendencia parece máxima en *Gr. elatior*, seguida de *Gr. funalis*, *Gr. decipiens*, *Gr. orbicularis*, *Gr. trichophylla* y, por último, *Gr. pulvinata*. El hidroma caulidial entra en contacto con estas células degradadas, excepto en *Gr. decipiens*. Así, las imágenes obtenidas en las especies *Gr. elatior*, *Gr. funalis*, *Gr. orbicularis* y *Gr. trichophylla* (figs. 25 B, 26 B, 27 B y 29 B), son absolutamente similares a las ofrecidas por Ligrone & Gambardella (1982a) en *Timmiella barbuloides*, por lo que, según su criterio, se debería considerar aquí la penetración del pie hasta la traza.

Sin embargo, se recalca que si se analizan especímenes algo más jóvenes de las mismas especies, estas células gametofíticas aparecen vivas, con paredes finas, pero no degradadas, o bien con ambos tipos celulares mezclados, lo que parece indicar que el contacto del pie con la traza de hidroides es un proceso dinámico, no de un carácter fijo. Posiblemente la "hidroidización" de las células gametofíticas circundantes al pie responde a la etapa en que el esporófito en desarrollo es tróficamente autosuficiente, y necesita tan sólo asegurar su aporte hídrico.

Entre sí, las especies difieren tanto en el desarrollo como en el aspecto de los engrosamientos laberínticos de las células a ambos lados de la placenta. En general, la tendencia apunta a una polarización de las paredes laberínticas (excepto en las células de transferencia esporofíticas no placentarias de *Gr. orbicularis*), tal y como se indica para otros musgos; a grosores similares para las paredes laberínticas de ambas fases, y de semejante magnitud en todas las especies; aunque *Gr. decipiens* destaca por su mayor desarrollo, y en esta especie y en *Gr. funalis* son sensiblemente más gruesos los del esporófito. También parece indicarse una mayor definición de los contornos de las irregularidades laberínticas en el gametófito, salvo en el caso de *Gr. pulvinata*. Los engrosamientos de las células de transferencia de estratos contiguos a los placentarios son en todas las especies de menor desarrollo, aunque las diferencias son menores en la vagínula. Con los estudios presentes no se puede valorar si estas diferencias tienen base taxonómica, ecológica, o se debe a la técnica de fijación o inclusión.

En cuanto a los caracteres citoplasmáticos, se observa de modo general (salvo en *Gr. elatior*, sin actividad celular registrada) una pérdida de actividad hacia el interior de la vagínula y del pie, puesta de manifiesto por la vacuolización, las figuras mielínicas, las guirnaldas concéntricas de retículo endoplasmático, etc. Esto concuerda con lo postulado por Ligrone & Gambardella (1988a). Aparece un único tipo de mitocondrias, de matriz densa, descrito por Browning & Gunning (1977) en *Funaria hygrometrica*, sin que parezca existir además ningún otro.

Los plastos de las células de transferencia esporofíticas son variados en las especies aquí consideradas. Ligrone & Gambardella (1988a) indican la alta frecuencia de pleomorfismos entre estos plastos, tal vez asociados con una reducción de sus funciones a la fotofosforilación (Browning & Gunning 1979), dada su posición interior en la planta, y la presumiblemente baja intensidad luminosa que reciben. Entre las especies estudiadas, solamente *Gr. orbicularis* y *Gr. trichophylla* presentan plastos pleomórficos, con distinta morfología en cada especie. Con los datos conocidos no es posible valorar si este carácter tiene una determinación taxonómica o se debe a condiciones ambientales de iluminación.

En la periferia de la vagínula de *Gr. elatior* se destaca la presencia de unas células de extraña estructura parietal, con el estrato interno muy disgregado y ocupando el interior celular, cuyo significado se desconoce, aunque podría corresponder a la diferenciación abortada de un nervio filidial.

La especialización de la zona de transición se refleja, además, en su escasez de plasmodesmos en la vagínula, y en los distintos resultados que ofrecen en las reacciones histoquímicas. La presencia de pectinas en el espacio placentario y la tinción metacromática con azul de toluidina de las paredes de las células de transferencia, se corresponde con lo descrito por Ligrone & Gambardella (1988a).



## ANATOMÍA: DISCUSIÓN GENERAL

En todas las estructuras estudiadas en las distintas especies, la diferenciación celular observada se funda principalmente en la organización de la pared.

Existe un modelo básico, con una pared primaria que incluye la lámina media, un material denso, más o menos homogéneo, y una estrecha banda más transparente a los electrones, fibrilar, con orientación paralela al contorno del lumen de la célula; y una pared secundaria de grosor variable, de fibrillas densamente dispuestas en idéntica orientación.

Con respecto a esto, los hidroides se diferencian por su condición de células muertas, vacías o con restos lipídicos o membranosos, y por la degradación de sus paredes, reducidas a trígonos bordeados y unidos por un material laxamente fibrilar que forma tabiques muy delgados (figs. 3 A, 7 A, 17 A, 22 A, 25 A). Normalmente es imposible distinguir su procedencia del estrato primario o secundario, aunque en los casos con menor degeneración se aprecia, junto a una estructura más o menos íntegra de la pared primaria, la participación del estrato secundario. El que los hidroides proceden de células con ambos estratos desarrollados, se sugiere por la presencia de células intermedias, en proceso de degradación, en el caulidio y vagínula circundantes a la zona de transición. Los trígonos muestran menor degradación (especialmente en la seta), aunque se han visto áreas perforadas en los correspondientes al caulidio de *Gr. funalis*, *Gr. torquata* y *Gr. incurva*. Los tabiques se han observado más o menos íntegros, pero jamás se han encontrado plasmodesmos, como los descritos en *Mnium* por Caputo & Castaldo (1968).

Bajo la denominación de hidroides, Hébant (1977) agrupa tanto las células con paredes laterales engrosadas de Polytrichales, como este tejido con tabiques hidrolizados. En ambos casos numerosos estudios han demostrado que son caminos preferentes para la conducción de agua, desde Haberlandt (1883, 1886) en gametófitos, y Vaizey (1887) en esporófitos, hasta los recogidos por Bopp & Weniger (1971) y Hébant (1977). Scheirer (1980) demostró para Polytrichales la restricción de la difusión lateral en la traza de hidroides, por la impermeabilización de las paredes. Es evidente que esto no puede ocurrir en trazas con paredes laterales degeneradas, con su subsiguiente alta permeabilidad (Hébant 1977), tal como ocurre en este caso. Sin embargo, debería investigarse si la distinta composición de las células adyacentes, que las protege de la degradación (e incluso extiende esta protección parcialmente a los hidroides contiguos), favorece la conducción axial.

La existencia de mayor desarrollo del hidroma en caulidios fértiles frente a estériles, y en ápices frente a bases, parece tendente a asegurar la conducción de agua a estructuras en alta actividad metabólica.

Los distintos tipos de células vivas presentan pocas diferencias en el estrato primario. Su constricción en estratos internos de la seta del caulidio puede deberse a una ligera deshidratación, como describe Mauseth (1988) en el colénquima de plantas vasculares.

Las modificaciones principales se encuentran en la pared secundaria. La aparición ocasional de un estrato interno más o menos reticulado (8 A, 17 A, 18 A, 22 C) en contacto con el lumen celular puede deberse a la degradación de los estratos más internos (es frecuente en células con citoplasma desorganizado), o bien a la orientación inicial transversa de la deposición de las microfibrillas de celulosa, como se ha postulado (Preston 1982) para plantas vasculares, sin que se conozcan estudios en briófitos. La presencia de bandas puede deberse a diferentes ritmos de deposición de material de pared, en cualquier caso, no aparecen de forma constante en células de posición, tamaño y grosor equivalentes, dentro de un mismo espécimen.

En cuanto a la variabilidad del grosor del estrato secundario en los distintos tejidos, de la periferia al centro de setas o caulidios, aun siendo grande, especialmente en las primeras, se produce de forma gradual. No siempre es fácil, por tanto, distinguir claramente los tejidos en función de la pared secundaria (las células de transferencia, por sus especiales características, son una excepción), y cuando es posible, es considerando en su conjunto la relación entre el grosor de la pared y el tamaño celular.

La delimitación, aun distinta para cada especie, parece ser relativamente oscura, más cuantitativa que cualitativa. Las pruebas histoquímicas colaboran en la distinción de la epidermis, especialmente en caulidios, mostrando una mayor deposición en ella de sustancias fenólicas. También indican, en ambos tejidos, la predominante naturaleza ácida de la pared, que se tiñe fuertemente con azul de Nilo y vira su coloración en disoluciones alcalinas.

En cuanto a la denominación de los tejidos, en plantas vasculares se considera "parénquima" al formado exclusivamente por paredes finas, sólo primarias (Mauseth 1988). En la acepción de parénquima como tejido fundamental, este término ha sido aplicado generalmente por todos los histólogos en briófitos. Mauseth (1988) restringe el término de pared secundaria a los estratos lignificados. Por ser los musgos carentes de lignina (como también se ha confirmado para las especies aquí analizadas de *Grimmia*), para este autor sólo poseerían paredes primarias. Sin embargo, esto no cuadra para los tejidos de células paquidermas aquí encontrados (figs. 4 B, 15 A).

Por otro lado, aunque en esta investigación los términos "pared primaria" y "pared secundaria" se han empleado en principio en sentido sólo posicional, su clara diferenciación a microscopía electrónica de transmisión, o por las pruebas histoquímicas, el variable grosor del secundario, y en especial su ausencia en las paredes celulares de las yemas (fig. 10 A), sugieren que se considere el estrato primario como el presente en las células en crecimiento, y el secundario, como el depositado cuando éste termina, es decir, en el mismo sentido que se emplea en plantas vasculares. Esto coincide con el criterio de algunos autores, por ejemplo Gunning & Pate (1974), que se refieren a los engrosamientos laberínticos de las células de transferencia como especializaciones de la pared secundaria.

Aunque se necesitan estudios más precisos sobre su composición, diferencia, ultraestructura y génesis, por las razones expuestas, se propone mantener el término "parénquima" en su acepción de tejido fundamental (Font-Quer 1985), y evitarlo para los tejidos con paredes celulares engrosadas, que podrían designarse atendiendo a su localización (como se ha realizado en este trabajo para la epidermis), o bien con el término general de estereoma, definido sólo por el engrosamiento de sus paredes y su función de sostén mecánico, y que es usado frecuentemente en briófitos (Wijk 1932, Hébant 1977, Ligrone & Gambardella 1988a).

La protección exterior por una cutícula es otra característica general observada en todas las epidermis (fig. 2 B, 15 A). El término "cutícula" es asimismo ambiguo, por haberse empleado a menudo para designar las paredes engrosadas en la epidermis. Aquí se ha limitado su sentido al propuesto por Hébant (1977), que equivale a la "cutícula propiamente dicha" de plantas vasculares (Mauseth 1988).

Aunque la protección que otorga la cutícula no evita la deshidratación (las especies de este género, como se ha indicado, son poiquilohídricas, con alta capacidad de recuperación), su presencia puede retrasarla, alargando así el tiempo de producción fotosintética neta.

Una observación importante es la referida a la invasión de microorganismos en los tejidos (fig. 30). Se conocen asociaciones micorrizógenas, saprofíticas o parasíticas entre briófitos y hongos, revisadas por Felix (1988). En este trabajo se recogen algunas en distintas especies de *Grimmia*, aunque no con microorganismos unicelulares como los aquí encontrados. Sin embargo, son más raras las referencias a combinaciones con bacterias. Algunos autores (Spiess et al. 1981, 1984) han afirmado el efecto positivo de las bacterias sobre el crecimiento en musgos. Las únicas reseñas que se conocen sobre degradación bacteriana de paredes briofíticas son las realizadas por el equipo de Satake, que describieron primero este proceso en hepáticas (Satake & Miyasaka 1984, Satake & Shibata 1986), y posteriormente en el musgo acuático *Drepanocladus fluitans* (Satake et al. 1990).

Estos autores informan de descomposición en tejidos muertos, no en células vivas. Los resultados que aquí se presentan coinciden en que la invasión nunca se produce en ápices activos (y es muy limitada incluso cuando sus células muestran desorganización citoplasmática), en tanto que es muy frecuente en regiones basales. Por no aparecer en todas las secciones con tejidos muertos, y por su presencia, muchas veces escasa, en éstos, se considera que no son los causantes de la desorganización citoplasmática, sino saprófitos oportunistas. El control que ejerce el musgo sobre su actividad parece eficaz, dado el perfecto aspecto y vitalidad mostrado por los ejemplares afectados. Incluso cuando se registra esta invasión en zona de transición y seta (*Gr. elatior*), el caulidio subyacente y la correspondiente cápsula aparentan normalidad en su desarrollo.

Los microorganismos detectados son tanto de organización eucariota como procariota (con y sin pared). Parecen ser comedores de pared, en las que se abren camino paralelamente a la orientación de las microfibrillas del estrato secundario, o inespecíficamente a través de los trígonos, formando túneles de mayor diámetro al de su célula. Sólo en la vagínula de *Gr. orbicularis* se han encontrado bacterias intracitoplasmáticas, aunque el tejido estaba igualmente en fase de degeneración.

Es destacable la vía preferente de entrada que los microorganismos encuentran en el gametófito, donde los túneles parten de la periferia hacia el interior. Apenas se han encontrado en seta, y cuando así ha sido (*Gr. elatior*), parecen proceder de la zona de transición subyacente, completamente invadida, sin que mostrasen señales las células epidérmicas de la seta. El mecanismo protector por parte de estas células se desconoce, aunque se apunta su posible relación con la mayor retención de actividad celular, en contraste con el gametófito, donde son las primeras en degenerar.

En análisis comparativo entre el caulidio y la seta, se observan las siguientes diferencias:

- El tejido epidérmico de la seta muestra mayor diferenciación, por la asimetría de las paredes secundarias tangenciales (que indica una polarización de la síntesis de pared), su forma específica y la tendencia de las células de estratos contiguos a disponerse opuestas.

- El estrato primario de la seta (al igual que el del filidio) forma una corona periférica engrosada, que falta en el caulidio. La resistencia de este estrato, ejemplificada en yemas ante el ácido sulfúrico concentrado, sugiere su contribución a la protección de estas estructuras, menos atacadas por microorganismos.



- En el estrato secundario de la seta aparece una deposición granular interna (fig. 20 A) que no se ha observado en el equivalente del caulidio.

- Se observa una diferente composición de la pared, puesta de manifiesto en la distinta coloración que toma en medios alcalinos, y en la mayor presencia de sustancias fenólicas en setas (y en filidios).

- Las comunicaciones plasmodesmáticas son mucho menos abundantes en la seta, donde además, a diferencia del caulidio, no se agrupan en campos de punteaduras primarias. No parece que estén implicadas en la translocación hacia el caulidio basal, como Alpert (1989) ha descrito para *Gr. laevigata*, dada la desorganización que éste muestra, sino que aparentan relacionarse con la conducción acrópeta. En setas, la detección de polisacáridos sugiere una presencia de parénquima conductor (probablemente con abundantes comunicaciones intercelulares) en su parte distal, que no ha sido demostrada. No se han encontrado, ni en setas ni en caulidios, células especializadas en la conducción de nutrientes equiparables a los leptoides.

- Se señala igualmente el distinto sentido de pérdida de actividad celular en caulidios y setas: se inicia en la periferia en aquéllos, y en el interior en éstas.

- Por último, se indica la menor diferenciación de la seta en relación a los caulidios con traza bien desarrollada, que indica una tendencia en el género, ya señalada por Lorch (1931), opuesta a la generalizada en musgos, donde la seta, por su escasa adaptación a la conducción hídrica externa, suele presentar mayor organización interna (Héban 1977). La relativa homogeneidad estructural de la seta en las especies aquí analizadas, en relación con la variabilidad del caulidio, puede reflejar que, al ser el gametófito de vida perenne, es la fase que debe hacer frente a las condiciones ambientales cambiantes y hostiles, respondiendo con diversas especializaciones, en tanto que el esporófito, de vida breve, una vez seleccionada en el antecesor común del grupo una configuración que le permite producir y dispersar con éxito las esporas, la mantiene en todas las especies.

Es notable la presencia de cristales (fig. 21 A) en el esporófito y gametófito de dos especies (*Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*), que, aunque ocasional, se añade a las escasas observaciones realizadas a este respecto en briófitos (Mann 1988). Dado que su composición mineral es desconocida, no es posible apuntar una hipótesis acerca de su acumulación por biomineralización o por transporte directo desde el exterior. Por un lado, los procesos de biomineralización han sido muy poco estudiados en briófitos, y no se conoce en qué condiciones se producen. Por otro, la toma directa explica difícilmente la presencia, exclusivamente en las regiones internas, de los cristales, que deberían atravesar los tejidos circundantes (sin espacios intercelulares), o bien provenir de las regiones basales, cruzando los tabiques transversales del hidroma. Adicionalmente, en el esporófito habrían de superar también la barrera placentaria entre ambas generaciones. Para solucionar esta cuestión y valorar significado biológico de la presencia de estos cristales, sería preciso investigar su composición en relación con la del sustrato, así como las condiciones que requiere su formación.

## PALINOLOGÍA: RESULTADOS

Se reseñan las siguientes características comunes a las esporas de todas las especies que se han encontrado fructificadas:

- Por su diámetro máximo medio, comprendido entre 10 y 25  $\mu\text{m}$  se pueden describir como *esporas pequeñas* (Erdtman 1969).

- No se han observado en ningún caso aperturas en su pared.

- En todos los casos, las observaciones ultraestructurales muestran que en la pared pueden distinguirse tres capas (a su vez subdivididas o no en varios estratos). Así, del interior hacia el exterior aparecen una intina, una exina y una perina, equiparables a las capas homónimas que aparecen en las esporas de los helechos y en los granos de polen de las fanerógamas (Azzfelius 1957).

- La exina no interviene en ningún caso en la formación de los relieves que constituyen la ornamentación externa de las esporas.

- Las pruebas histoquímicas dan un resultado positivo para la detección de componentes polisacáridos y fenólicos de pared celular en un estrato interno, y negativo en otro externo. El pequeño tamaño de las esporas hace que la resolución del microscopio óptico no sea suficiente para distinguir a qué capas de la pared (intina, exina o perina) corresponden estos datos.

- Por lo general son unicelulares, aunque se han observado tabicaciones en algunas esporas de *Gr. funalis*, tal vez como primera etapa de una germinación endospórica.

En cada especie se han observado las características que se detallan más adelante. La terminología seguida para la descripción de la ornamentación externa es la propuesta por Faegri & Iversen (1989).

***Gr. decipiens***

Esporas irregularmente subesféricas, ocasionalmente plano-convexas, con diámetro máximo de 13-20  $\mu\text{m}$  (16  $\mu\text{m}$  de media), fig. 31 B. Externamente presentan una ornamentación formada por báculos y verrugas irregulares y anastomosados, algo más densamente concentrados hacia el polo proximal. A su vez estos elementos presentan procesos secundarios verrucoides de distribución abundante e irregular (fig. 31 A).

En cuanto a la ultraestructura de la pared, desde el interior hacia el exterior, aparecen las siguientes capas (fig. 31 C):

\* Intina: forma una capa continua biestrata. Su grosor es de 0,3  $\mu\text{m}$  en toda la pared, salvo en el polo proximal de la espora, donde alcanza 0,7  $\mu\text{m}$ . El estrato interno constituye en toda la pared un tercio del grosor de la intina, es más denso a los electrones y posee una estructura fibrilar laxa, con las fibras más internas perpendiculares a la pared. El estrato externo presenta una estructura compacta, en ocasiones de apariencia granular.

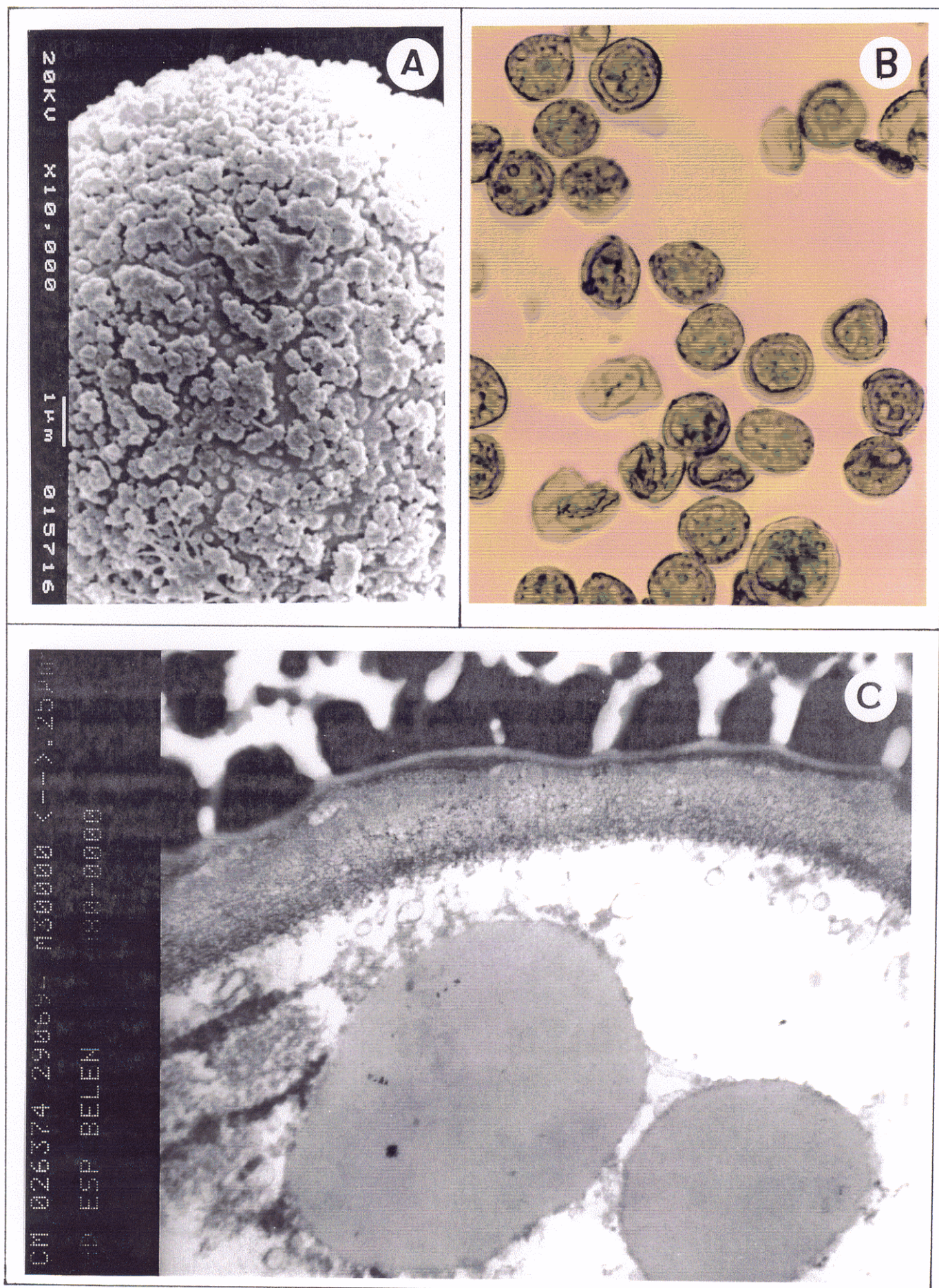
\* Exina: constituye una capa continua, relativamente delgada. En el lateral de la pared de la espora y en el polo distal, la exina alcanza 0,08  $\mu\text{m}$  y aparece compuesta por dos estratos: uno interno, bastante denso a los electrones, y otro externo, poco electrondenso. Con frecuencia este último se divide en lamelas, separadas por un material semejante al del interno. Estas lamelas son irregularmente sinuosas, pero no se interrumpen. En el polo proximal el grosor de la exina no supera 0,04  $\mu\text{m}$ , el estrato interno no es aparente y el externo se presenta como una capa compacta, no lamelar.

---

**Fig. 31.** A: Espora de *Gr. decipiens*, a MEB. B: Esporas de *Gr. decipiens*, sin tinción, 850 $\times$ . C: Corte de espora de *Gr. decipiens*, a MET.

---











\* Perina: aparece como una capa de un grosor de 0,8  $\mu\text{m}$ , sin apenas variaciones en toda la pared, y se observa constituida por elementos primarios muy densos a los electrones, muy irregulares y ramificados, que cubren algo más densamente el polo proximal. Los elementos secundarios aparecen como un material poco denso a los electrones, muy abundante, que interconecta irregularmente los relieves primarios.

Las observaciones ultraestructurales en el citoplasma muestran que está en buena parte ocupado por grandes cloroplastos (de hasta 3  $\mu\text{m}$ ), en los que no se distinguen claramente los apilamientos tilacoidales. Se observan abundantes y grandes gotas lipídicas (fig. 31 C).

***Gr. elatior***

Esporas de forma variable, de subesféricas a elipsoidales, ocasionalmente concavo-convexas, con diámetro máximo de 12-19  $\mu\text{m}$  (14  $\mu\text{m}$  de media), fig. 32 B. Su ornamentación externa está constituida por báculos, verrugas o clavas anastomosados, con relieve marcadamente menor en el polo proximal. Aparecen escasos elementos secundarios sobre su superficie (fig. 32 A).

La ultraestructura de su pared es como sigue (fig. 32 C):

\* Intina: forma una capa continua, uniestrata, bastante densa a los electrones, con reticulado compacto. Su grosor, de 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  en la pared lateral, decrece paulatinamente hacia el polo distal, donde apenas alcanza 0,05  $\mu\text{m}$ , y aumenta de manera gradual hacia el polo proximal hasta 0,4-0,5  $\mu\text{m}$ .

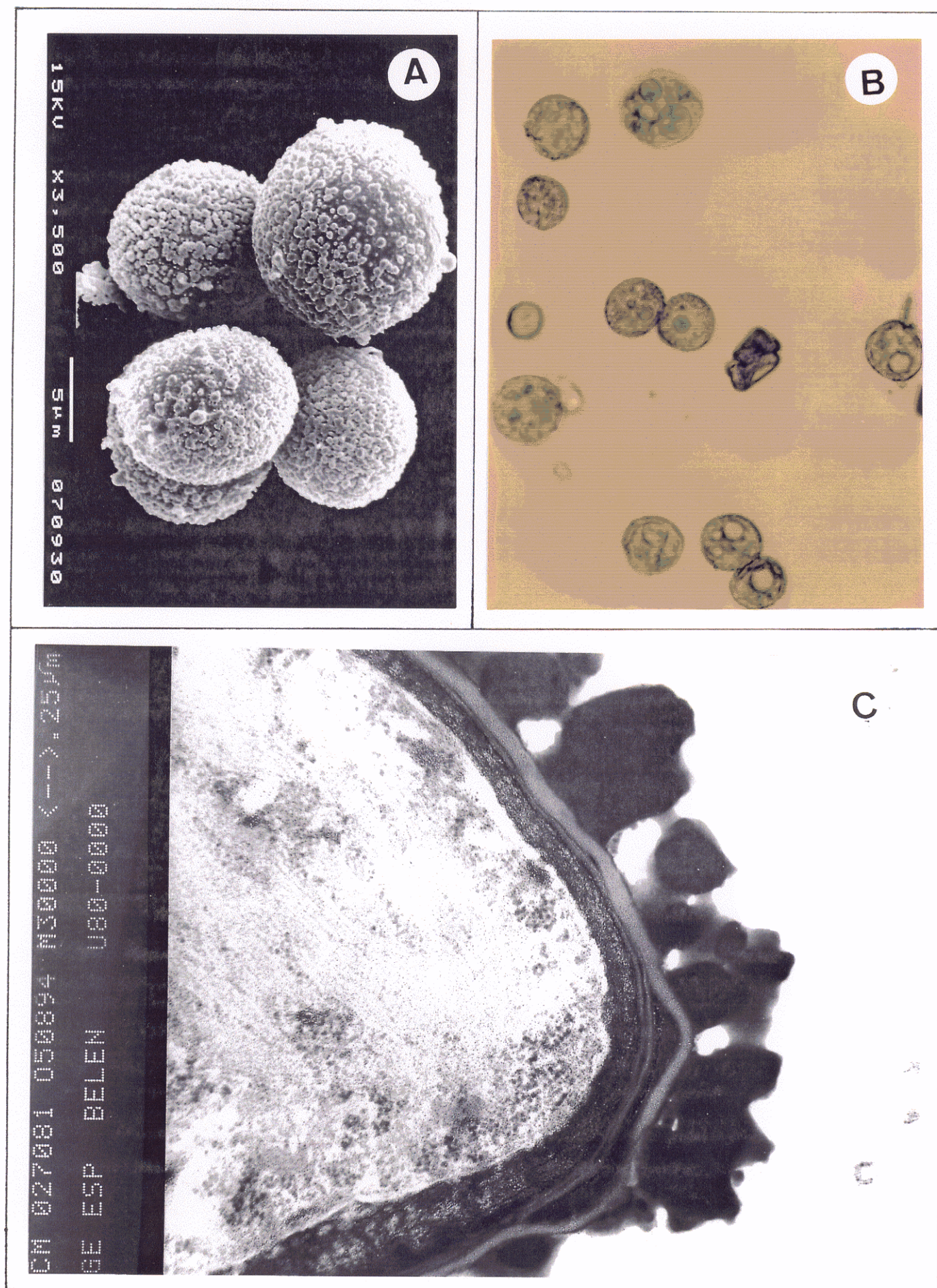
\* Exina: constituye una capa continua, de grosor escasamente variable, entre 0,08  $\mu\text{m}$  y 0,1  $\mu\text{m}$ , formada por dos estratos. El interno es bastante electrondenso, el externo es poco denso a los electrones y presenta un aspecto granular. En los ángulos y en el polo proximal aparece formado por lamelas con material intercalado entre ellas semejante al del estrato interno. Las lamelas, irregularmente sinuosas, no rompen la continuidad de este estrato. En el polo distal se presenta con un aspecto compacto, no lameloso, apoyado sobre el estrato interno.

---

**Fig. 32.** A: Esporas de *Gr. elatior*, a MEB. B: Esporas de *Gr. elatior*, sin tinción, 850 $\times$ . C: Corte de espora de *Gr. elatior*, a MET.

---







\* Perina: aparece con un grosor más o menos uniforme de 0,5-0,6  $\mu\text{m}$ , y está constituida por elementos discretos. Los relieves primarios son muy densos a los electrones, más o menos regulares (0,55 x 0,35  $\mu\text{m}$ ), no ramificados, contactando o casi los adyacentes, ocasionalmente anastomosados. Los relieves secundarios son papilosos, bastante transparentes a los electrones, poco abundantes sobre la superficie externa de los primarios.

En el citoplasma se encuentran grandes plastos (hasta de 2,5  $\mu\text{m}$ ), con organización interna poco definida (fig. 32 C). Aparecen también algunas vacuolas, interpretadas por Olesen & Mogensen (1978) como posibles acúmulos lipídicos mal fijados.



***Gr. funalis***

Esporas de subesféricas a elipsoidales, con diámetro máximo de 15-25  $\mu\text{m}$  (19  $\mu\text{m}$  de media), fig. 33 B. Su ornamentación externa está formada por pequeñas verrugas, ocasionalmente anastomosadas e irregularmente distribuidas, con muy escasos elementos secundarios en su superficie (fig. 33 A).

Las observaciones ultraestructurales de la pared revelan las siguientes capas (fig. 33 C):

\* Intina: forma una capa continua, bastante densa a los electrones, triestrata, de 1-1,5  $\mu\text{m}$  de grosor. Los dos estratos internos son continuos, de estructura laxamente reticulada, ocasionalmente con granulaciones más oscuras y a menudo delimitados internamente por una banda difusa, igualmente oscura. El más externo de ellos es un 50% más grueso. En el caso de haber tabiques intercelulares, éstos se muestran continuos con el estrato más interno. El estrato periférico de la intina es de presencia y grosor muy irregular, con una estructura fibrilar muy laxa. Su presencia provoca la deformación de las capas suprayacentes, originando un resalte en el contorno externo de la espora. En el polo distal, el grosor de la intina es menor (0,75-1  $\mu\text{m}$ ), frecuentemente falta el estrato externo y la diferenciación entre los internos es menos nítida.

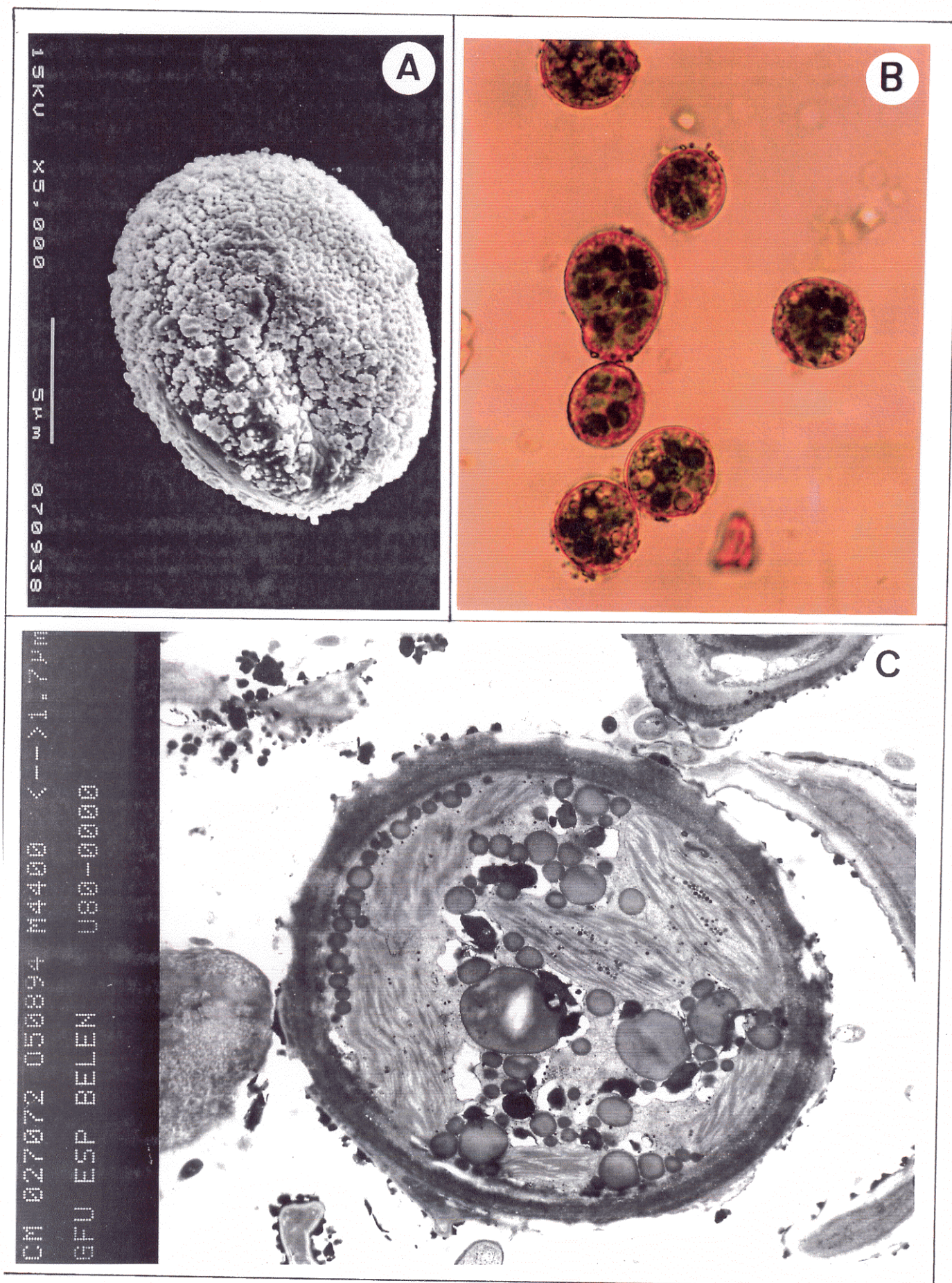
\* Exina: constituye una capa muy delgada (0,05  $\mu\text{m}$ ), discontinua, con presencia que se corresponde con la aparición del estrato periférico de la intina, con una capa externa poco electrondensa que no forma lamelas, y otra interna, que forma una banda estrecha y oscura.

---

**Fig. 33.** A: Espora de *Gr. funalis*, a MEB. B: Esporas de *Gr. funalis*, sin tinción, 850 $\times$ . C: Corte de espora de *Gr. funalis*, a MET.

---









\* Perina: presente sólo donde lo está también la exina, y con un grosor de 0,2-0,4  $\mu\text{m}$ , está constituida por elementos primarios muy electrondensos, discretos, no ramificados, aislados entre sí, con elementos secundarios de aparición muy ocasional sobre su superficie externa.

El citoplasma se ve en su mayor parte ocupado por plastos muy conspicuos y abundantes, de hasta 5  $\mu\text{m}$ , con apilamientos tilacoidales claramente definidos, y por gotas lipídicas. El color verde que presentan al microscopio óptico puede deberse a la importancia del aparato plastidial, unido al escaso grosor de la exina y la perina (fig. 33 C).

***Gr. orbicularis***

Esporas de forma subesférica, frecuentemente plano- o concavo-convexas con diámetro máximo de 9,5-15,5  $\mu\text{m}$  (12,5  $\mu\text{m}$  de media), fig. 34 B. Su superficie está ornamentada por verrugas o clavazas frecuentemente anastomosadas, con escaso relieve en el polo proximal. Los elementos secundarios aparecen muy raramente (fig. 34 A).

La ultraestructura de la pared muestra las siguientes capas (fig. 34 C):

\* Intina: forma una capa continua, de 0,2  $\mu\text{m}$  de grosor, de aspecto laxamente reticulado, biestrata. El estrato interno (un tercio del grosor de la intina) es bastante denso a los electrones, el externo es medianamente electrondenso. En el polo distal el grosor de la intina decrece a 0,08  $\mu\text{m}$ , en el proximal aumenta hasta 0,4  $\mu\text{m}$ .

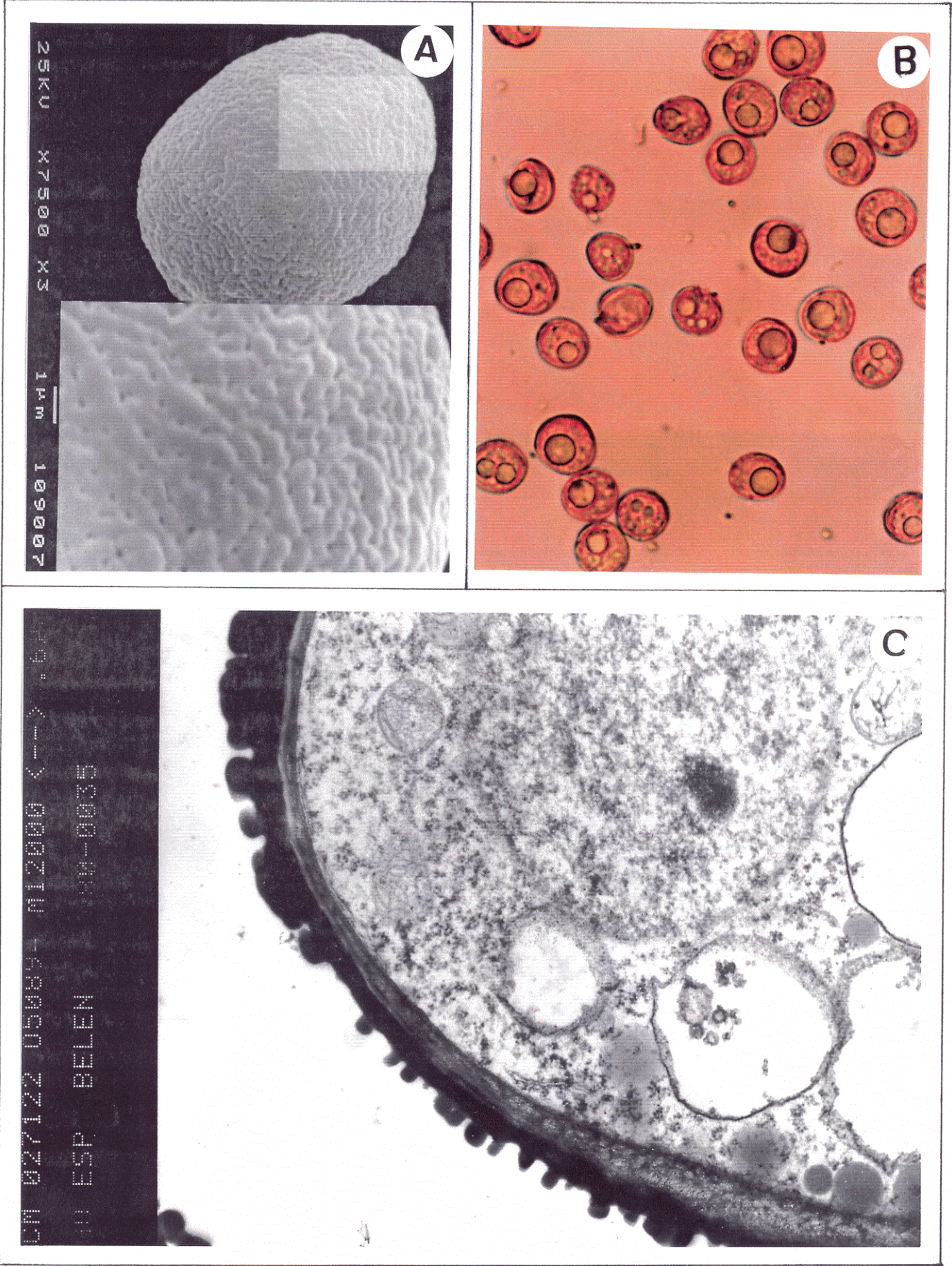
\* Exina: constituye una capa biestrata, muy delgada (0,02  $\mu\text{m}$ ). El estrato interno es medianamente opaco, el externo, poco denso a los electrones, en los laterales y hacia el polo proximal aparece dividido en lamelas irregularmente sinuosas, que no interrumpen la continuidad de esta capa, separadas entre sí por un material semejante al del estrato interno. En el polo proximal la exina se adelgaza hasta dejar ocasionalmente de ser aparente. En el distal la exina se presenta uniestrata (tan sólo se observa el estrato externo) y compacta, no lamelosa, con mayor grosor (de hasta 0,08  $\mu\text{m}$ ).

---

**Fig. 34.** A: Espora de *Gr. orbicularis*, a MEB. B: Esporas de *Gr. orbicularis*, sin tinción, 850 $\times$ . C: Corte de espóra de *Gr. orbicularis*, a MET.

---











\* Perina: aparece como una capa continua muy electrondensa, de 0,3  $\mu\text{m}$  de grosor en el lateral de la pared, constituida por 1-2 estratos de los que sobresalen relieves no ramificados, frecuentemente anastomosados por su extremo distal. Se observa ocasionalmente material de densidad electrónica similar al que constituye los elementos secundarios en otras especies, en este caso formando protuberancias que llegan a ser semejantes en forma y tamaño a las anteriormente descritas. En el polo distal la perina alcanza 0,4  $\mu\text{m}$  de grosor y la cubierta continua es biestrata, en el polo proximal el grosor se reduce a 0,2  $\mu\text{m}$ , la cubierta continua es uniestrata y los relieves son menores.

Las observaciones sobre el citoplasma muestran, preferentemente hacia el polo proximal, plastos de reducido tamaño (0,5-1  $\mu\text{m}$ ), con organización tilacoidal poco definida, así como mitocondrias y abundantes vacuolas que son, probablemente, restos de gotas lipídicas (Olesen & Mogensen 1978). En algunas se ha observado núcleo y nucléolo (fig. 34 C).

***Gr. pulvinata***

Esporas de forma subesférica, de plano- a concavo-convexas, con diámetro máximo de 7-12  $\mu\text{m}$  (9,5  $\mu\text{m}$  de media), fig. 35 C. Externamente presentan una ornamentación formada por clavaverrugas anastomosadas, con escaso o nulo relieve en el polo distal. Se presentan abundantes elementos secundarios verrucoides en la superficie de los relieves primarios (figs. 35 A, B).

La ultraestructura de la pared revela la siguiente estratificación (figs. 35 A, B):

\* Intina: forma una capa continua de 0,2  $\mu\text{m}$  de grosor en el lateral de la pared, uniestrata, bastante densa a los electrones, de aspecto compacto, algo granular. Hacia el polo distal se adelgaza hasta 0,1  $\mu\text{m}$ , en tanto que hacia el proximal se engruesa alcanzando 0,3-0,4  $\mu\text{m}$ .

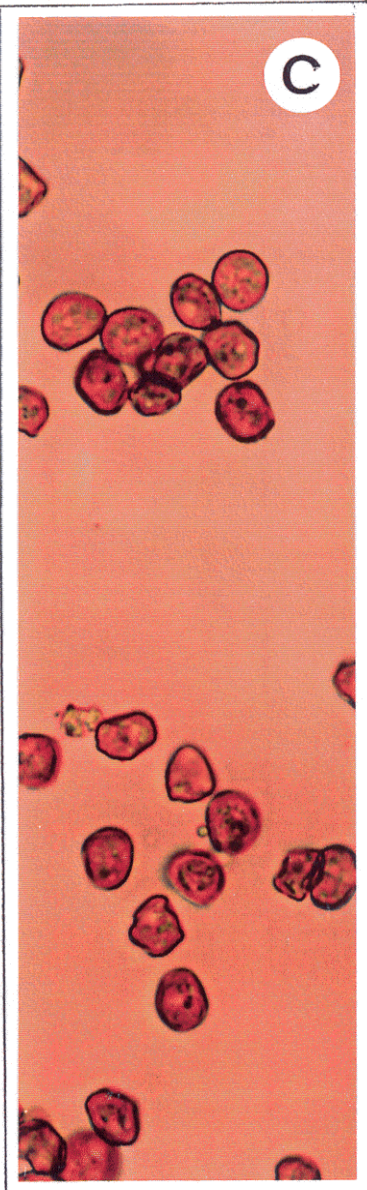
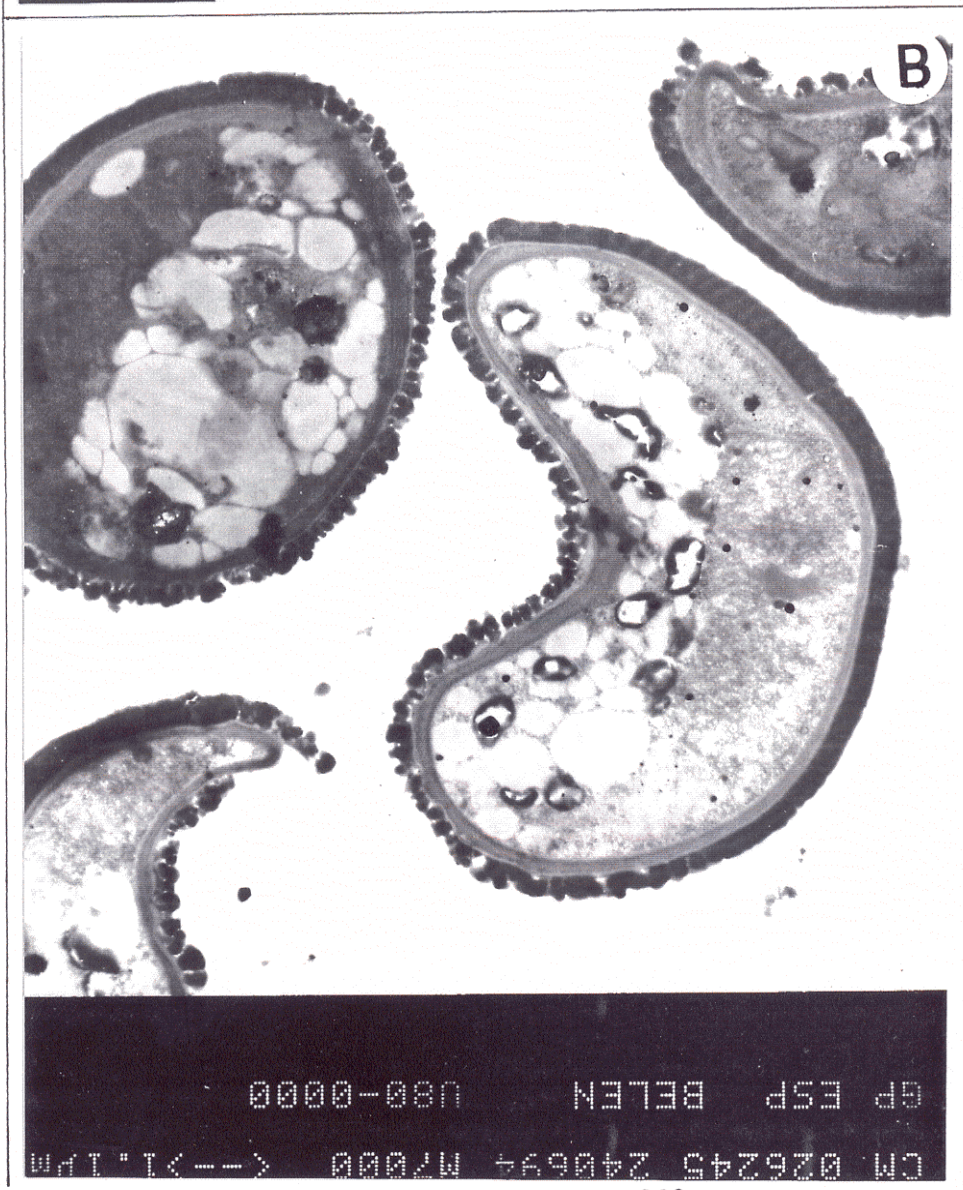
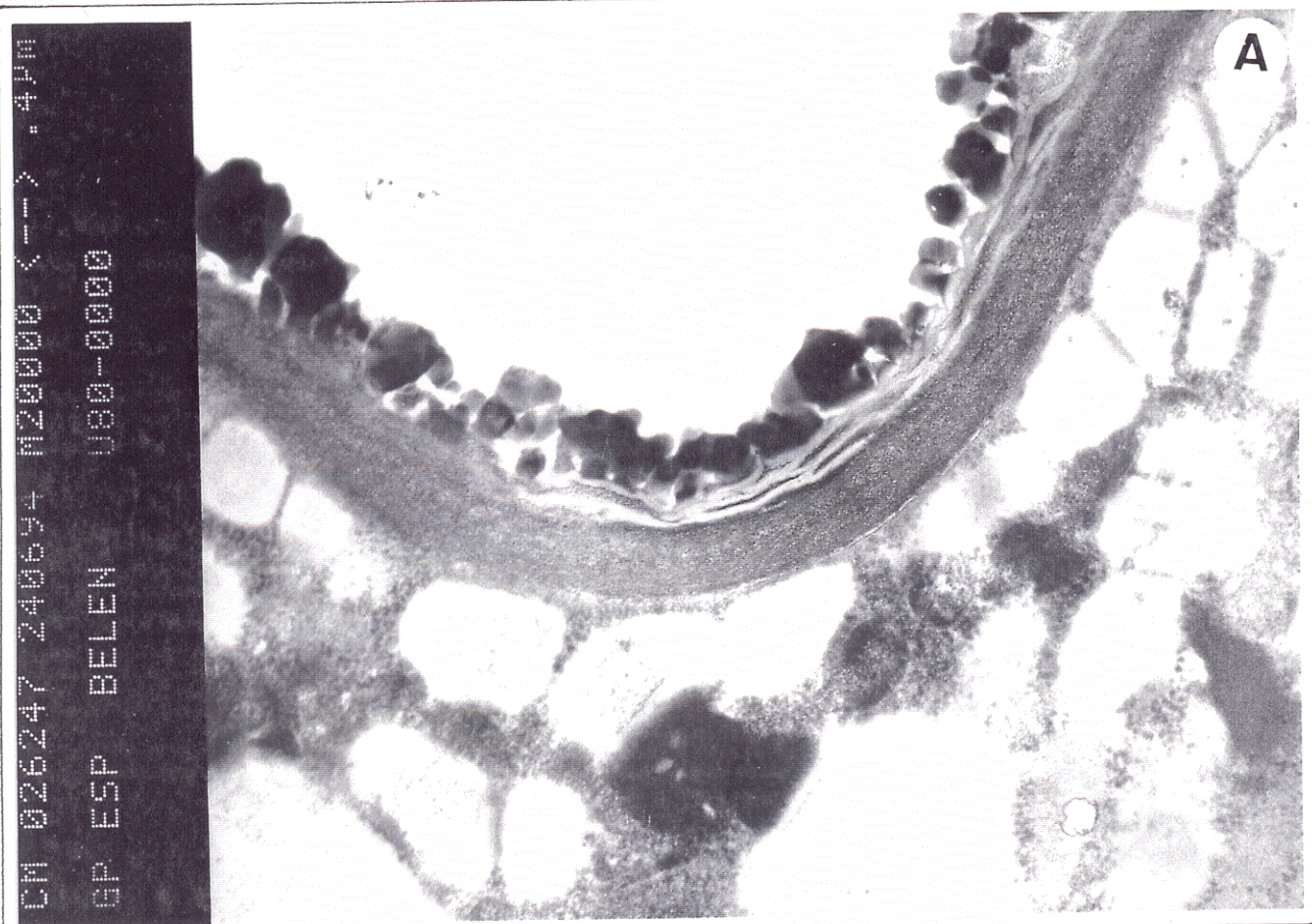
\* Exina: constituye una capa continua, relativamente delgada (0,15  $\mu\text{m}$  en el lateral de la pared). Se subdivide en dos estratos: el interno es bastante opaco; el externo, poco denso a los electrones, es lameloso en el polo proximal y en los ángulos, con lamelas irregularmente sinuosas que no rompen la continuidad de esta capa, y con un material electrondenso, semejante al del estrato interno, intercalado entre ellas. En el polo distal, la exina aparece formada exclusivamente por el estrato externo, que se presenta como una capa de 0,1  $\mu\text{m}$  de grosor, compacta, no lamelosa.

---

**Fig. 35.** A: Corte de espora de *Gr. pulvinata*, a MET. B: Corte de esporas de *Gr. pulvinata*, a MET. C: Esporas de *Gr. pulvinata*, sin tinción, 850 $\times$ .

---









\* Perina: aparece como una capa de 0,3  $\mu\text{m}$  de grosor, formada por elementos primarios muy electrondensos, poco o nada ramificados, que en el polo distal aumentan algo su grosor y se anastomosan totalmente originando una cubierta continua, sin relieve, de 0,3-0,4  $\mu\text{m}$ , en tanto que en el proximal permanecen como protuberancias algo menores, discretas, ocasionalmente anastomosadas, que forman una capa de 0,25  $\mu\text{m}$ . Los elementos secundarios, de un material poco denso a los electrones, se observan con gran abundancia y de forma muy irregular interconectando los relieves primarios del polo proximal, sin que se hayan encontrado en el distal.

En el citoplasma aparecen cloroplastos relativamente pequeños (1,5-2  $\mu\text{m}$ ), con organización tilacoidal poco definida, así como numerosas vacuolas, preferentemente orientadas hacia el polo proximal, semejantes a las interpretadas por Olesen & Mogensen (1978) como acúmulos lipídicos (fig. 35 B).

***Gr. trichophylla***

Esporas de forma elipsoidal, en ocasiones ligeramente plano-convexas, con diámetro máximo de 9,5-19  $\mu\text{m}$  (13  $\mu\text{m}$  de media), fig. 36 B. La ornamentación de su superficie externa está constituida por báculos o verrugas (a menudo clavadas en el polo proximal), algunas veces anastomosadas, con abundancia de elementos secundarios papilosos (fig. 36 A).

La pared muestra las siguientes capas en su ultraestructura (fig. 36 C):

\* Intina: forma una capa continua, uniestrada, relativamente delgada (0,1  $\mu\text{m}$  en el lateral de la pared), medianamente densa a los electrones, de aspecto laxo. Hacia el polo proximal, su grosor aumenta hasta 0,2  $\mu\text{m}$ , mientras que se adelgaza a 0,06  $\mu\text{m}$  hacia el distal.

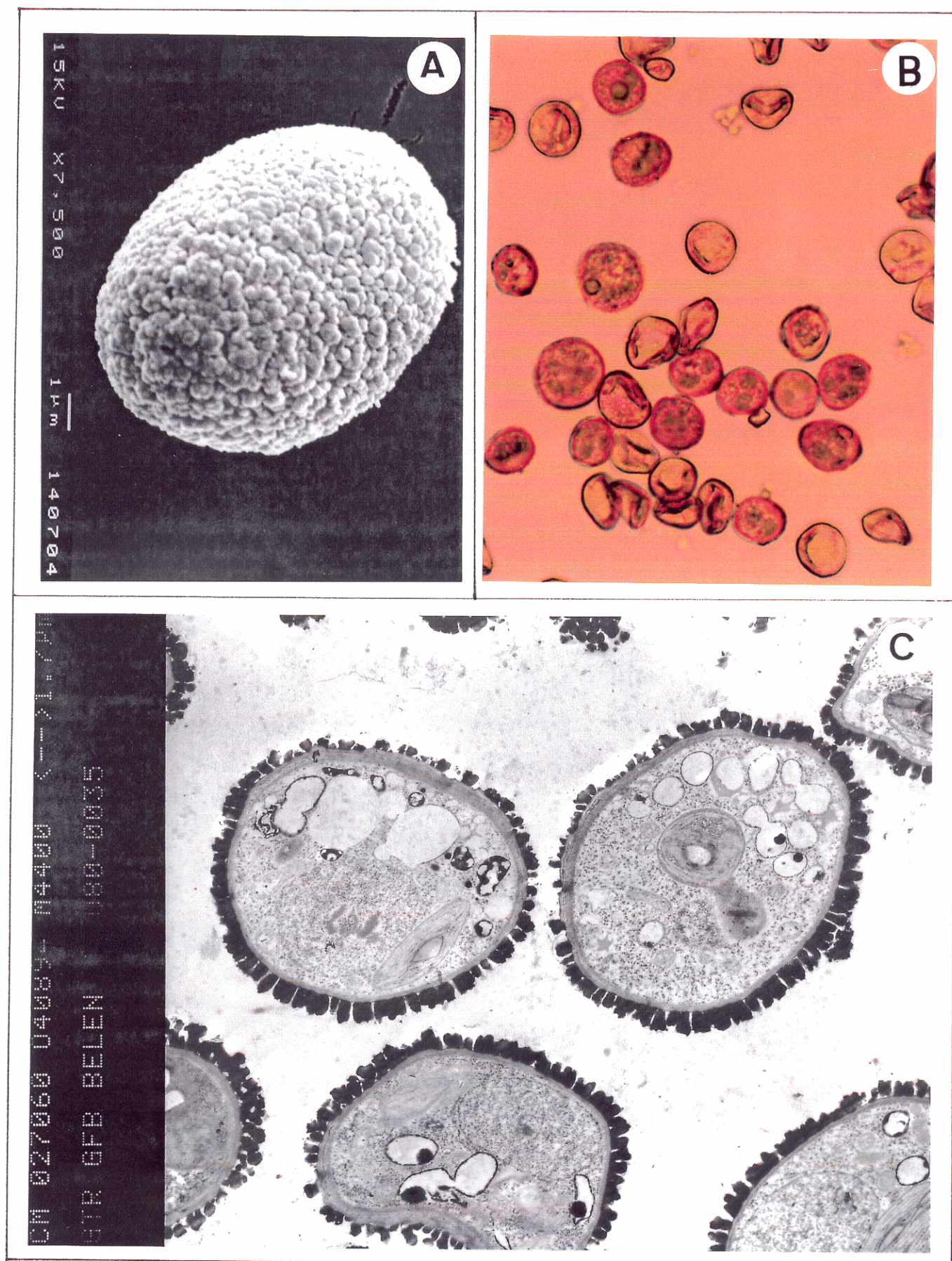
\* Exina: constituye una capa continua, biestrada, de grosor poco variable (0,1  $\mu\text{m}$ ). El estrato interno es bastante denso a los electrones, y sólo aparece ocasionalmente. El externo es más transparente, y frecuentemente, en los ángulos y en el polo proximal, se muestra subdividido en lamelas, irregularmente sinuosas pero que mantienen la continuidad de la capa, con un material intercalado entre ellas semejante al del estrato interno.

---

**Fig. 36.** A: Espora de *Gr. trichophylla*, a MEB. B: Esporas de *Gr. trichophylla*, sin tinción, 850 $\times$ . C: Corte de esporas de *Gr. trichophylla*, a MET.

---







\* Perina: aparece con un grosor de 0,4  $\mu\text{m}$  en el lateral de la pared, está constituida por elementos primarios discretos, muy densos a los electrones; que en el polo distal son bastante regulares, nunca se ramifican, contactan frecuentemente entre sí y presentan mayor tamaño (0,5  $\mu\text{m}$ ), y en el proximal son frecuentemente claviformes, irregulares, pueden presentar ocasionales ramificaciones, aparecen más separadas y dan un grosor a la perina de 0,3  $\mu\text{m}$ . Los elementos secundarios se observan con baja densidad electrónica, y con presencia más abundante sobre los relieves del polo proximal.

La ultraestructura del citoplasma revela la presencia de cloroplastos de gran tamaño (hasta 3  $\mu\text{m}$ ), con apilamientos tilacoidales claramente organizados, abundantes mitocondrias y, frecuentemente hacia el polo proximal, vacuolas susceptibles de ser interpretadas como gotas lipídicas mal fijadas (Olesen & Mogensen 1978). Se han obtenido también imágenes del nucléolo en el interior del núcleo (fig. 36 C).



## CUADRO-RESUMEN DE LAS OBSERVACIONES SOBRE ESPORAS

|                        | MORFOLOGÍA EXTERNA  |  | ESTRUCTURA INTERNA   |  |  |  |
|------------------------|---|--|--|--|--|--|
|                        | Tamaño<br>( $\mu$ m más o menos)<br>y forma   | Ornamentación  | Intina   | Exina  | Perina   | Citoplasma   |
| <i>Gr. decipiens</i>   | 16 $\mu$ m.<br>Irregularmente<br>subesféricas.  | Báculos y<br>verrugas<br>irregulares<br>anastomosados.<br>Elementos<br>secundarios<br>verrucoides.<br>Polarización<br>poco marcada.                                      | 0,3 $\mu$ m en pared<br>lateral.<br>Continua.<br>Biestrata.<br>Polarización:<br>hasta 0,8 $\mu$ m en<br>el polo<br>proximal.   | 0,08 $\mu$ m en<br>pared lateral.<br>Continua.<br>Biestrata. Capa<br>externa<br>lamelosa.<br>Polarización:<br>uniestrata,<br>compacta y<br>adelgazada a<br>0,04 $\mu$ m en el<br>polo proximal.                                    | 0,8 $\mu$ m.<br>Dividida en<br>elementos<br>discretos.<br>Elementos<br>primarios muy<br>irregulares y<br>ramificados.<br>Elementos<br>secundarios<br>abundantes e<br>irregulares.<br>Polarización<br>poco marcada.   | Cloroplastos de<br>hasta 3 $\mu$ m, con<br>tilacoides de<br>organización<br>poco clara.<br>Abundantes<br>lípidos de<br>reserva.  |
| <i>Gr. elatior</i>     | 14 $\mu$ m.<br>Subesféricas a<br>elipsoidales.<br>Ocasionalmente<br>concavo-<br>convexas. | Báculos,<br>verrugas o<br>clavas<br>anastomosados.<br>Escasos<br>elementos<br>secundarios.<br>Polarización:<br>ornamentación<br>más escasa en el<br>polo proximal.       | 0,2-0,3 $\mu$ m en<br>la pared<br>lateral.<br>Continua.<br>Uniestrata.<br>Polarización:<br>0,4-0,5 $\mu$ m en<br>polo proximal,<br>0,05 $\mu$ m en el<br>polo distal.  | 0,08-0,1 $\mu$ m en<br>pared lateral.<br>Continua.<br>Biestrata. Capa<br>externa<br>lamelosa.<br>Polarización:<br>uniestrata y<br>compacta en el<br>polo distal.   | 0,55 $\mu$ m.<br>Dividida en<br>elementos<br>discretos.<br>Elementos<br>primarios +<br>regulares, de<br>0,55 x 0,35<br>$\mu$ m,<br>contactando<br>entre sí o<br>casi, no<br>ramificados.<br>Escasos<br>elementos<br>secundarios.<br>Polarización<br>poco marcada.  | Cloroplastos de<br>hasta 2,5 $\mu$ m<br>con tilacoides<br>de organización<br>poco clara.<br>Grandes vacuolas<br>posiblemente<br>correspondientes<br>a lípidos de<br>reserva. |
| <i>Gr. funalis</i>     | 19 $\mu$ m.<br>Subesféricas a<br>elipsoidales.  | Verrugas<br>pequeñas,<br>ocasionalmente<br>anastomosadas.<br>Elementos<br>secundarios muy<br>escasos.<br>Polarización<br>poco marcada.                                   | 1 $\mu$ m en pared<br>lateral.<br>Continua.<br>Triestrata.<br>Capa más<br>externa muy<br>irregular. Capa<br>interna en<br>continuidad con<br>tabiques<br>intercelulares<br>de presencia<br>ocasional.<br>Polarización:<br>estratificación<br>más definida,<br>0,75-1 $\mu$ m en el<br>polo distal. | 0,05 $\mu$ m.<br>Discontinua, en<br>correspondencia<br>con la<br>aparición de la<br>capa externa de<br>la intina.<br>Biestrata.<br>Polarización<br>poco marcada.   | 0,2-0,4 $\mu$ m.<br>Dividida en<br>elementos<br>discretos.<br>Falta donde lo<br>hace la exina.<br>Elementos<br>primarios<br>separados, no<br>ramificados.<br>Elementos<br>secundarios<br>escasos.  | Abundantes<br>cloroplastos de<br>hasta 2,5 $\mu$ m, con<br>claros<br>apilamientos<br>tilacoidales.<br>Lípidos de<br>reserva muy<br>abundantes.                               |
| <i>Gr. orbicularis</i> | 12,5 $\mu$ m.<br>Subesféricas a<br>plano-convexas o<br>concavo-<br>convexas.              | Verrugas o<br>clavas<br>frecuentemente<br>anastomosadas.<br>Muy escasos<br>elementos<br>secundarios.<br>Polarización:<br>ornamentación<br>escasa en el<br>polo proximal. | 0,2 $\mu$ m en la<br>pared lateral.<br>Continua.<br>Biestrata.<br>Polarización:<br>0,4 $\mu$ m en el<br>polo proximal,<br>0,08 $\mu$ m en el<br>polo distal.   | 0,02 $\mu$ m en la<br>pared lateral.<br>Biestrata.<br>Polarización:<br>capa externa<br>lamelosa o bien<br>no aparente<br>hacia el polo<br>proximal,<br>uniestrata y<br>compacta, de<br>hasta 0,08 $\mu$ m<br>en el polo<br>distal. | 0,3 $\mu$ m en la<br>pared lateral.<br>Continua. 1-2<br>estratos de<br>los que<br>sobresalen<br>separadamente<br>los relieves<br>primarios, no<br>ramificados,<br>frecuentemente<br>anastomosados<br>por su parte<br>externa.<br>Elementos<br>secundarios<br>muy escasos,<br>salvo los<br>semejantes en<br>tamaño a los<br>primarios.<br>Polarización:<br>0,4 $\mu$ m en el<br>polo distal,<br>uniestrata,<br>con menores<br>relieves y 0,2<br>$\mu$ m en el polo<br>proximal. | Cloroplastos de<br>0,5-1 $\mu$ m, de<br>organización<br>tilacoidal poco<br>clara. Grandes<br>vacuolas,<br>posiblemente<br>correspondientes<br>a lípidos de<br>reserva.       |

|                  | MORFOLOGÍA EXTERNA   |   | ESTRUCTURA INTERNA  |   |   |  |
|------------------|--|---|---|---|---|--|
|                  | Tamaño<br>(a más-medio)<br>y forma                                     | Ornamentación   | Intina  | Exina   | Perina  | Citoplasma   |
| Gr. pulvinata    | 9,5 $\mu\text{m}$<br>Plano-convexas a<br>concavo-convexas.             | Clavas o<br>verrugas<br>anastomosadas.<br>Elementos<br>secundarios<br>verrucoides<br>abundantes.<br>Polarización:<br>ornamentación de<br>escaso o nulo<br>relieve en el<br>polo distal. | 0,2 $\mu\text{m}$ en la<br>pared lateral.<br>Continua.<br>Uniestrata.<br>Polarización:<br>0,3-0,4 $\mu\text{m}$ en<br>el polo<br>proximal, 0,1<br>$\mu\text{m}$ en el polo<br>distal. | 0,15 $\mu\text{m}$ en<br>pared lateral.<br>Continua.<br>Biestrata. Capa<br>externa<br>lamelosa.<br>Polarización:<br>0,1 $\mu\text{m}$ ,<br>uniestrata y<br>compacta en el<br>polo distal.   | 0,3 $\mu\text{m}$ en la<br>pared lateral.<br>Elementos<br>primarios,<br>poco o nada<br>ramificados,<br>discretos o<br>totalmente<br>anastomosados<br>formando una<br>cubierta<br>continua.<br>Elementos<br>secundarios<br>abundantes.<br>Polarización:<br>0,25 $\mu\text{m}$ y<br>elementos<br>discretos en<br>el polo<br>proximal, 0,3-<br>0,4 $\mu\text{m}$ y<br>cubierta<br>continua en el<br>polo distal.   | Cloroplastos de<br>1,5-2 $\mu\text{m}$ , con<br>organización<br>tilacoidal poco<br>clara.<br>Abundantes<br>vacuolas hacia<br>el polo<br>proximal,<br>posiblemente<br>correspondientes<br>a lípidos de<br>reserva.        |
| Gr. trichophylla | 13 $\mu\text{m}$<br>Elipsoidales,<br>ocasionalmente<br>plano-convexas. | Báculos,<br>verrugas o<br>clavas,<br>ocasionalmente<br>anastomosadas.<br>Elementos<br>secundarios<br>papilosos<br>abundantes.   | 0,1 $\mu\text{m}$ en pared<br>lateral.<br>Continua.<br>Uniestrata.<br>Polarización:<br>0,2 $\mu\text{m}$ en el<br>polo proximal,<br>0,06 $\mu\text{m}$ en el<br>polo distal.          | 0,1 $\mu\text{m}$ en la<br>pared lateral.<br>Continua.<br>Biestrata.<br>Polarización:<br>uniestrata y<br>compacta en el<br>polo distal,<br>ocasionalmente<br>biestrata y con<br>capa externa<br>lamelosa en<br>ángulos y polo<br>proximal | 0,4 $\mu\text{m}$ en la<br>pared lateral.<br>Elementos<br>primarios<br>raramente<br>ramificados,<br>discretos,<br>ocasionalmente<br>anastomosados.<br>Elementos<br>secundarios<br>abundantes.<br>Polarización:<br>0,3 $\mu\text{m}$ ,<br>elementos más<br>separados, a<br>menudo<br>claviformes,<br>con<br>ocasionales<br>ramificaciones<br>y mayor<br>abundancia de<br>elementos<br>secundarios en<br>el polo<br>proximal, 0,5<br>$\mu\text{m}$ , elementos<br>verrucoides no<br>ramificados y<br>a menudo<br>anastomosados<br>en el polo<br>distal. | Cloroplastos de<br>hasta 3 $\mu\text{m}$ y con<br>organización<br>tilacoidal<br>clara.<br>Abundantes<br>vacuolas, a<br>menudo hacia el<br>polo proximal,<br>posiblemente<br>correspondientes<br>a lípidos de<br>reserva. |

## PALINOLOGÍA: DISCUSIÓN

Sobre este género existen dos trabajos previos que se refieren exclusivamente a la morfología externa de las esporas. El realizado por Hirohama (1978) incluye, entre los 47 taxones que estudia, las siguientes especies objeto de esta tesis: *Gr. elatior*, *Gr. funalis*, *Gr. incurva*, *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla*. El publicado por Mateu & Puche (1984) describe, entre otras, las esporas de *Gr. decipiens*, *Gr. orbicularis*, *Gr. pulvinata* (var. *pulvinata* y var. *africana*) y *Gr. trichophylla*. Además, Cao & Vitt (1986) incluyen, en su descripción de *Gr. pulvinata*, una imagen a microscopía electrónica de barrido de su espora, sobre la que no realizan ningún comentario.

En cuanto a los caracteres de forma y tamaño de las esporas, dada la influencia directa que sobre ellos ejerce el ambiente (Reitsma 1969), no son considerados de especial relevancia, por más que en este caso el efecto ambiental se haya intentado minimizar partiendo siempre de esporas totalmente hidratadas y sometidas al mismo tratamiento posterior.

En cualquier caso, las especies estudiadas no muestran grandes diferencias con respecto a ellos. Si bien, en cuanto a la forma de las esporas, *Gr. decipiens*, *Gr. funalis* y *Gr. trichophylla* parecen distinguirse por su mayor tendencia a la isopolaridad, y en cuanto a su diámetro máximo medio, *Gr. funalis* (por su gran tamaño) y *Gr. pulvinata* (por su pequeñez), parecen destacar del resto, la variabilidad encontrada en ambos caracteres se solapa con la que presentan las demás especies. Estos datos están básicamente en concordancia con los que mencionan los autores de las distintas descripciones de las especies, así como por Hirohama (1978) y Mateu & Puche (1984). El pequeño tamaño de las esporas sería indicativo de su alta capacidad de dispersión (Clarke 1979), como, por otro lado, parece sugerir la amplitud del área de distribución de estas especies. Sin embargo, no se han realizado estudios al respecto en esta tesis.



La ornamentación, siempre que se trate de esporas maduras, se considera para un mismo taxón como un carácter más constante que los dos anteriores, si bien Taylor et al. (1972) encontraron diferencias entre esporas de *Asterella tenera* (Mitt.) Schust. procedentes de poblaciones silvestres y de cultivos axénicos.

Las observaciones referentes a relieves primarios no contradicen en general, para las especies correspondientes, los datos publicados; aunque, en el caso de *Gr. pulvinata*, las diferencias de la ornamentación en los polos proximal y distal de la espora, que Mateu & Puche (1984) interpretan como debidas a diversos tipos de elementos esculturales, se consideran aquí como causadas por la fusión de elementos de una misma clase. Las disparidades referentes a la densidad de relieves en los polos de las esporas pueden deberse a la distinta procedencia de los especímenes estudiados o, tal vez, a que las observaciones de Hirohama (1978) y Mateu & Puche (1984) han sido efectuadas sobre esporas no secadas a punto crítico, frecuentemente colapsadas, lo que sin duda ha debido dificultar la apreciación de las diferencias de relieve en las distintas zonas de la superficie de la espora. El trabajo de Cao & Vitt (1986) parece mostrar una vista proximal de la espora, con lo que no añade datos para aclarar esta cuestión.

Con respecto a los relieves secundarios, sin embargo, existe cierto desacuerdo tanto entre los autores citados como entre sus observaciones y las de este trabajo. Dichos relieves se han observados en todas las especies aquí estudiadas. Sin embargo, *Gr. elatior*, *Gr. funalis*, *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla* son descritas como carentes de estos elementos por Hirohama (1978); así como *Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata* (no así *Gr. pulvinata* var. *africana*, en cambio), por Mateu & Puche (1984), quienes, por otra parte, indican su presencia en *Gr. trichophylla*. En este trabajo, en *Gr. funalis* se han encontrado muy raramente elementos secundarios, y en *Gr. orbicularis* se han hallado con igual escasez, descontando los observados al microscopio electrónico de transmisión, y que por su gran tamaño no permiten ser diferenciados de los relieves primarios al microscopio electrónico de barrido (fig. 34 C). Por esto, la disparidad es escasa para estas dos especies. Sin

embargo, la presencia de relieves secundarios en las restantes es siempre notoria, e incluso se dan con gran abundancia en *Gr. pulvinata* (la imagen de la espora de esta especie, aportada por Cao & Vitt 1986, parece estar asimismo en concordancia con los resultados aquí obtenidos). Esta discrepancia puede deberse, bien a que las esporas analizadas en algunos trabajos no hayan alcanzado la completa madurez, o bien a la distinta procedencia geográfica de las poblaciones estudiadas en esta investigación y en los mencionados trabajos, lo que sugiere que el carácter puede estar condicionado por factores ambientales.

En conjunto, la ornamentación externa permite diferenciar las esporas de la siguiente forma:

. con relieves primarios poco destacados (*Gr. funalis*, *Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*). A su vez, entre sí difieren por el grado de anastomosis de estos elementos: *Gr. funalis* presenta la menor tendencia a la fusión, *Gr. orbicularis* un grado intermedio, y *Gr. pulvinata*, el más alto (con fusión completa en el polo distal).

. con relieves primarios destacados (*Gr. decipiens*, *Gr. elatior* y *Gr. trichophylla*). Entre ellas destaca *Gr. decipiens* por su mayor resalte y cobertura, mientras que *Gr. elatior* muestra mayor diferencia entre el polo proximal y el distal que *Gr. trichophylla*.

Con respecto a la estructura interna de la pared, existen escasos trabajos sobre esporas de briófitos, y ninguno en la familia Grimmiaceae. La estratificación encontrada corresponde a la descrita por Azfelius (1957) y corroborada por McClymont & Larson (1964) para varias especies de musgos: una intina (subestratificada o no), una exina que contribuye o no a la ornamentación externa de la espora, y una perina, en general muy opaca a los electrones.

La presencia de una intina continua se corresponde con lo publicado hasta la fecha con respecto a ultraestructura de esporas briofíticas. La estratificación de esta capa ha sido observada por varios autores (Olesen & Mogensen 1978, Brown et al. 1982a, b, Carrión et al. 1993). Entre ellos, tan sólo el último compara esporas de musgos de un mismo género, y ni consideran los caracteres de la intina como de especial relevancia para su diferenciación taxonómica ni, a través de las fotografías, se aprecia una distinta estratificación de esta capa en los diversos taxones estudiados.

Sin embargo, en esta tesis, las esporas de algunas especies han mostrado tener intina uniestrata (*Gr. elatior*, *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla*), biestrata (*Gr. decipiens* y *Gr. orbicularis*), o triestrata (*Gr. funalis*). En este último caso es preciso subrayar el hecho de que la irregularidad de la capa periférica de la intina se traduzca en relieves en el contorno de la espora (fig. 33 C), dado que la contribución de la intina a la ornamentación externa no ha sido previamente observada. La ausencia de estudios al respecto impide valorar la importancia de la estratificación de la intina en cuanto a la ecología de las especies, su diferenciación taxonómica o la comprensión de la evolución interna del grupo.

Por otro lado, también la exina ha aparecido como una capa continua, con las excepciones de *Gr. funalis*, donde se aprecian claras interrupciones (fig. 33 C), y de *Gr. orbicularis*, en la que se adelgaza tanto en el polo proximal que ha resultado imposible confirmar su presencia o su desaparición. En todos los casos se muestra como una capa muy delgada en relación a la observada en otros musgos por McClymont & Larson (1964), Olesen & Mogensen (1978), Brown et al. (1982a, b) y Carrión et al. (1993). Aunque han aparecido diferencias en el espesor de la exina de las esporas de las distintas especies estudiadas, dado el escaso grosor es difícil establecer si son artefactos debidos al ángulo de corte o si son intrínsecas.

Además, en este trabajo se ha observado en todos los casos la biestratificación, más o menos irregular, de esta capa. Con anterioridad, McClymont & Larson (1964), Olesen & Mogensen (1978), y Brown et al. (1982a, b) han informado acerca de esta característica de la exina.

El estrato externo de la exina en las especies de *Grimmia* aquí estudiadas corresponde, por su posición, aspecto y densidad electrónica, a lo que los anteriores autores describen como la típica exina de las esporas de musgos. Una característica peculiar es, sin embargo, la organización irregular en lamelas sinuosas (fig. 35 A) que, salvo en *Gr. funalis*, se ha encontrado en todos los casos. Brown et al. (1982a, b) indican la aparición de dos capas lamelares (la interna y la externa) en la exina triestrata de *Sphagnum lescurii*. Sin embargo, por estar la interna formada por láminas muy finas, regulares y completamente unidas entre sí, y la externa por lamelas irregulares pero mucho más transparentes a los electrones, discontinuas y entremezcladas con la perina, no se consideran como equivalentes a la capa analizada. El que estos autores se refieran a estas capas como exclusivas de esfagnos, y solamente señalen el estrato medio como homólogo a la exina que aparece en el resto de los musgos, parece corroborar esta interpretación. También dicho estrato medio puede presentar laminillas en su parte distal, pero por su escaso grosor en relación al estrato completo no pueden considerarse semejantes a las lamelas de la exina aquí observadas. En los mencionados trabajos de Brown et al. (1982a, b) se describen como consecuencia de la deposición de material de la exina. Un análisis parecido es aplicable a las laminillas de la cara interna de la exina que Olesen & Mogensen (1978) señalan en la zona de apertura de algunos musgos.

Dentro de las hepáticas, en Marchantiales y Sphaerocarpaceas, Denizot (1976) ha descrito la presencia de "ensembles exiniques élémentaires" (conjuntos exínicos elementales), que considera comparables a los de la endexina del polen de angiospermas, mientras que en Metzgeriales y Jungermanniales, Heckman (1970), denomina "sheet lamellae" a unas estructuras que Neidhart (1979) considera equiparables a las anteriores. La ubicación y el aspecto que ofrecen estas estructuras lamelares es semejante al que muestra este estrato en las especies de *Grimmia* estudiadas, salvo en que éste no presenta lamelas a lo largo de todo el contorno de la espora. Sin embargo, en hepáticas existe un estrato suprayacente comparable a la ectexina del polen, que en estas esporas falta, dificultando la interpretación como endexina de la capa que se discute.

En musgos, por otro lado, tan sólo se ha visto un caso semejante al aquí cuestionado. En el artículo de Carrión et al. (1993) aparece una fotografía de la espora de *Pottia starckeana* agg., donde la exina muestra una similar organización en lamelas, pero los autores no realizan ningún comentario al respecto. Por ello, se carece de base para la interpretación de esta característica. El hecho de que se dé preferentemente en el polo proximal parece sugerir que, al dejar de ser compacta, la exina se debilita en esta zona, siguiendo la tendencia que Mogensen (1983) apunta para los briófitos. Sin embargo, esto no explica su frecuente aparición en los ángulos ni que el patrón se invierta en *Gr. decipiens*, donde la exina es compacta en el polo proximal y lamelosa en el distal. La estructura lamelosa de esta capa podría relacionarse con una cierta plasticidad de la exina para permitir cambios higroscópicos de forma y volumen de la espora, que presenta cierta capacidad de expansión. Se destaca que el aspecto del estrato externo de la exina es bastante homogéneo en todos los casos, con excepción de *Gr. elatior*, donde muestra una textura granular.

En cuanto al estrato interno de la exina, McClymont & Larson (1964) constatan la presencia de una capa delgada y densa a los electrones entre la intina y la exina, semejante a la que aparece en las esporas de estas seis especies de *Grimmia*, y que estos autores consideran como una subunidad de la exina. Sin embargo, Olesen & Mogensen (1978) describen una capa similar, que aparece en la zona de apertura de las esporas, interpretándola como una parte de la intina. Aquí se ha seguido el criterio de McClymont & Larson (1964), dado que la capa observada parece compuesta de un material diferente al de la intina y puede entremezclarse con el estrato suprayacente (fig. 35 C), que es semejante a la exina descrita como típica en los musgos. Por otra parte, su aparición, si bien no es constante en todo el contorno de la exina (excepto en *Gr. funalis*, donde la exina en su conjunto no es continua), no se restringe a una región delimitada que pueda interpretarse como la zona de apertura de la espora, lo que la hace menos comparable al estrato descrito por Olesen & Mogensen (1978). Un estudio sobre la composición de esta capa en relación con las restantes podría dilucidar esta cuestión, así como su significado en cuanto a la síntesis o degradación de las capas adyacentes.

La perina muestra una considerable variabilidad en estas especies, tanto en su grosor como en el tipo y densidad de elementos esculturales que la componen. Tan sólo en *Gr. orbicularis* cubre de forma continua y compacta la totalidad de la superficie de la espora, y en *Gr. pulvinata*, su hemisferio distal. En el resto, siempre está exclusivamente formada por elementos discretos, más o menos fusionados, raramente o nada ramificados, salvo en *Gr. decipiens*, que proporcionan un recubrimiento muy denso en esta especie, algo menos en *Gr. trichophylla* y *Gr. elatior*, y bastante laxo en *Gr. funalis*.



Considerando la esporodermis en su conjunto, en estas especies se observa como una capa continua que aísla el interior celular del exterior. Si, según lo demostrado por McClymont & Larson (1964) y Olesen & Mogensen (1978), la intina es de naturaleza polisacárida, y son las capas que forman la esporodermis externa (exina y perina), resistentes a la acetólisis, las que proporcionan la mayor resistencia de la espora a las condiciones adversas, las observaciones aquí realizadas muestran que esta esporodermis externa es, exceptuando *Gr. funalis*, igualmente continua para todas las especies. En *Gr. orbicularis* la exina llega a hacerse inconspicua, en tanto que la perina forma una capa ininterrumpida. En las restantes es la exina la que marca la continuidad de la esporodermis externa. La presencia de una exina y una perina frecuentemente interrumpidas en *Gr. funalis* puede deberse a un inicio del proceso de germinación, o bien ser una característica de sus esporas maduras, relacionada tal vez con una estrategia de, una vez liberadas, hacer inmediato dicho proceso (ocasionalmente, incluso se han observado fases iniciales de la germinación dentro de las cápsulas). Con respecto al grosor del conjunto formado por la exina y la perina, las especies pueden ordenarse (sin que existan grandes diferencias entre ellas), de mayor a menor espesor, como sigue: *Gr. decipiens*, *Gr. elatior*, *Gr. trichophylla*, *Gr. orbicularis*, *Gr. pulvinata* y *Gr. funalis*.

La polaridad de las esporas analizadas queda marcada, no tanto por la forma, como por el distinto grosor de las capas de la esporodermis en una y otra cara. Estas diferencias no se señalan tan abrupta y delimitadamente en una región como para caracterizar una zona de apertura, pero en todos los casos, al menos por el grosor no homogéneo de la intina, se ha podido distinguir un polo distal y uno proximal. Las especie con polos más diferenciados en cuanto al grosor de la intina son *Gr. decipiens* y *Gr. elatior*. Menos marcados a este respecto los tienen *Gr. orbicularis*, *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla*. La especie con intina de grosor más homogéneo en todo su contorno es *Gr. funalis*. Además de la intina, las capas externas de la endodermis remarcen esta polaridad ofreciendo diferencias de grosor o estructura de una cara a otra en *Gr. orbicularis*, *Gr. pulvinata* y *Gr. trichophylla*, en tanto que en *Gr. decipiens* y *Gr. elatior* tan sólo la exina contribuye significativamente a la polaridad. En *Gr. funalis* estas capas se muestran semejantes en ambos polos.

Autores como Heckman (1970), Horton (1982) y Mogensen (1981) han discutido el significado evolutivo de los caracteres de la esporodermis. Para Horton (1982), las esporas isopolares y de esporodermis transparente (lo que implica escaso desarrollo de la exina y de la perina), caracterizan el estado plesiotípico. Heckman (1970) y Mogensen (1981) consideran asimismo que el engrosamiento de la pared constituye una línea de especialización en briófitos. Según esto, serían las esporas de *Gr. funalis* las que reunirían los caracteres esporodérmicos más primitivos. Las diferencias entre las otras especies parecen menos significativas, dado que, en primer lugar, no son muy notorias y, en segundo lugar, los datos de polaridad no se corresponden con los de grosor. Es posible que otros factores, como el tipo de elementos esculturales que conforman la perina, o su grado de fusión, sean también de importancia en estas valoraciones.

En cuanto al interior celular, los lípidos se configuran como principal sustancia de reserva en todos los casos, lo que está de acuerdo con lo observado en las restantes fases de la ontogenia de estas especies. Por otra parte, Neidhart (1979) considera habitual en las esporas maduras de briófitos la presencia de cloroplastos grandes y bien desarrollados, en tanto que Mogensen (1981) sugiere que la pluricelularidad es un carácter primitivo, y que la condición unicelular y la reducción del aparato plastidial son consecuencia de una línea de especialización. A este respecto, la unicelularidad parece casi general, con la excepción ocasional de *Gr. funalis*. Sin embargo, el aspecto de los cloroplastos presenta mayor variabilidad, encontrándose unos de gran tamaño y apilamientos tilacoidales bien estructurados en *Gr. funalis* y *Gr. trichophylla*, otros también grandes pero sin organización clara de las lamelas tilacoidales en *Gr. decipiens* y *Gr. elatior*, y otros relativamente pequeños, con sistema tilacoidal igualmente poco definido, en *Gr. orbicularis* (donde la reducción estructural y de tamaño es máxima), y en *Gr. pulvinata*. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que las características del aparato plastidial podrían relacionarse con factores ecológicos, correspondiendo la reducción del mismo a una limitación de la actividad fisiológica (limitación incompleta, pues al menos en *Gr. orbicularis* se han obtenido imágenes del nucléolo, lo que muestra actividad de transcripción en el núcleo),

como adaptación para conseguir un mayor tiempo de latencia, y asociándose, por el contrario, su desarrollo completo a la ausencia de dilación entre la liberación de la espora madura y su germinación, sin que tenga que soportar condiciones ambientales adversas. Se precisan estudios sobre capacidad de las esporas briofíticas de reducir sus cloroplastos a proplástidos, sobre la facilidad que el medio ofrece para la germinación en el momento de su dispersión, así como sobre los tiempos máximos de latencia que consiguen, para dar una valoración concluyente de este carácter.

Considerando en su conjunto los caracteres analizados, se perfilan tres posibles niveles en la evolución de las esporas de este grupo.

1. esporas en ocasiones pluricelulares, casi isopolares, de exina y perina muy delgadas, de sistema plastidial bien desarrollado (posiblemente más cercanas al antecesor común del grupo): *Gr. funalis*.

2. esporas de pared poco heteropolar en todos sus estratos, con ornamentación perínica desarrollada, formada por elementos discretos, con sistema plastidial bien desarrollado: *Gr. trichophylla*.

3. esporas de intina marcadamente heteropolar, y exina y perina ligeramente heteropolares, con sistema plastidial reducido: *Gr. decipiens*, *Gr. elatior*, *Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*. A su vez, en este grupo pueden trazarse dos líneas de especialización diferentes:

. perina formada por elementos discretos; cloroplastos de gran tamaño: *Gr. elatior* y *Gr. decipiens*. Esta última representaría el grado más avanzado, por la relativa complejidad de la perina, con alto recubrimiento de relieves primarios muy ramificados.

. perina formada por elementos con tendencia a fundirse en una cubierta continua; reducción del tamaño de los cloroplastos: *Gr. pulvinata* y *Gr. orbicularis*. Ésta habría alcanzado mayor especialización, al lograr una cubierta perínica continua en todo el contorno de la espora y al presentar la máxima reducción en tamaño y estructura interna de los cloroplastos.

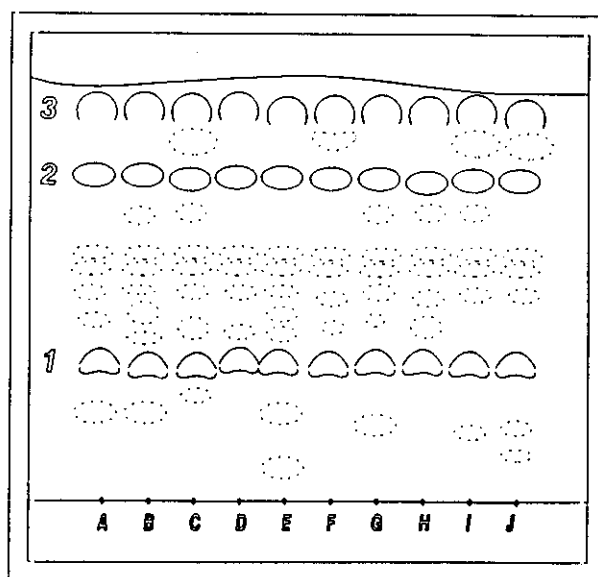
La diversidad aquí encontrada con respecto al grosor de exina y perina, así como en relación con la reducción del aparato plastidial, que en ambos casos se consideran líneas de especialización en briófitos, indica, o bien que estas especies están más alejadas filogenéticamente de lo que cabría esperar por su pertenencia a la misma sección, o bien el valor discutible de estos caracteres (por otra parte muy escasamente estudiados en la división Bryophyta) como indicadores evolutivos.

En cuanto a la posible utilización taxonómica de los caracteres de la espora, se observa que todas las especies resultan diferenciables en cuanto a éstos, y que especies consideradas cercanas (*Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*, o *Gr. decipiens*, *Gr. elatior* y *Gr. trichophylla*), aun mostrando cierta semejanza, pueden ser separadas, lo que parece prometedor. Sin embargo, sería preciso extender esta investigación a taxones subespecíficos antes de incluir estos caracteres en las claves.

## FITOQUÍMICA: RESULTADOS

En el cromatograma correspondiente a la prueba preliminar aparecieron las siguientes manchas<sup>1</sup> comunes a todas las especies:

n-hexano:acetato de etilo (80:20)



A: *Gr. decipiens*  
B: *Gr. elatior*  
C: *Gr. funalis*  
D: *Gr. hartmanii*  
E: *Gr. incurva*  
F: *Gr. orbicularis*  
G: *Gr. pulvinata*  
H: *Gr. retracta*  
I: *Gr. torquata*  
J: *Gr. trichophylla*

Compuesto 1:  $R_f = 0,3$

Compuesto 2:  $R_f = 0,8$

Compuesto 3:  $R_f = 0,95$

Datos cromatográficos para n-hexano:acetato de etilo (90:10)

Compuesto 1:  $R_f = 0,08$

Compuesto 2:  $R_f = 0,6$

Compuesto 3:

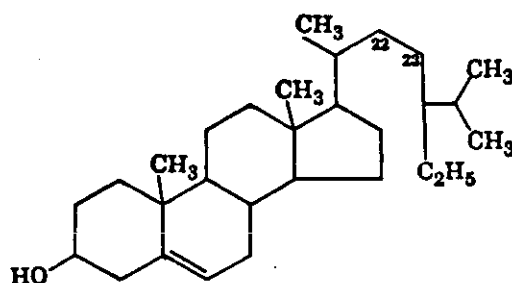
3a:  $R_f = 0,7$

3b:  $R_f = 0,95$

<sup>1</sup> Se han representado sólo las aplicaciones correspondientes a extractos etanólicos.

Tras obtener 8,33 g de extracto de *Gr. pulvinata*, se procedió al análisis de los mencionados compuestos.

El compuesto 1, tras su revelado con *oleum*, presentaba un color rosado con luz ultravioleta mientras que con luz visible aparecía rosa fuerte, para luego virar a castaño verdoso. Una vez aislado (16,2 mg), dio positivo para esteroides en la reacción de Liebermann-Burchard. La acetilación con piridina:anhídrido acético (1:3) durante 48 horas y el posterior análisis de un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (gráfico 2) confirmaron la presencia de un grupo hidroxilo. Los datos de cromatografía en capa fina y de  $^1\text{H}$ -RMN (gráficos 1, 3), en relación con la sustancia patrón, permiten identificarlo como  $\beta$ -sitosterol.

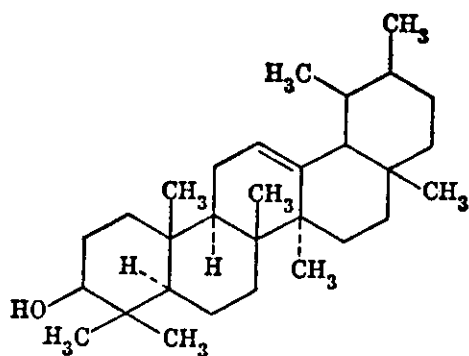


$\beta$ -sitosterol

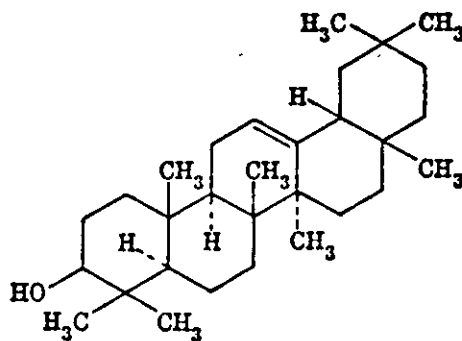


El compuesto 2 manifestaba, en la placa cromatográfica revelada, una fluorescencia amarillento-rojiza al observarse bajo luz ultravioleta, y un color castaño amarillento con luz visible. Tras su aislamiento (7,7 mg), los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN (gráfico 4) se asemejaban a los presentados por el ácido linoleico (gráfico 5), aunque con algunas diferencias que sugerían su posible esterificación. La co-cromatografía en capa fina con una muestra patrón, desarrollada en n-hexano:acetato de etilo (90:10) dio como resultado un distinto  $R_f$  de ambas manchas (ácido linoleico:  $R_f = 0,1$ , compuesto 2:  $R_f = 0,6$ ) que sin embargo presentaban igual aspecto a la luz visible y ultravioleta. El compuesto 2 fue seguidamente saponificado a  $60^\circ\text{C}$  durante 6 horas en disolución de sosa metanólica. Los resultados de cromatografía en capa fina fueron idénticos para la muestra patrón y para el compuesto 2, que fue, por tanto, identificado como **ácido linoleico**, aunque debe encontrarse en forma esterificada en estos musgos.

El compuesto 3, que dio resultado positivo en la reacción de Liebermann-Burchard para triterpenos, se desdobló en dos sustancias al correr la placa cromatográfica en n-hexano-acetato de etilo (90:10): 3a y 3b. Ambas aparecían con fluorescencia anaranjada a la luz ultravioleta, y con un color castaño rojizo, que viraba a los pocos minutos a castaño-morado, a la luz visible. Tras aislarlas (3a: 4,6 mg, 3b: 12,2 mg), los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (gráficos 6, 7, 10) y de IR (gráfico 8) parecen indicar la presencia de una mezcla de triterpenos. La espectrometría de masas (gráficos 9, 11, 12), que proporciona patrones de fragmentación característicos de los distintos tipos de triterpenos, sugiere la posible presencia de compuestos relacionados con la **amirina** (Budzikiewicz et al. 1963), si bien no se han conseguido identificar definitivamente.



$\alpha$ -amirina



$\beta$ -amirina

Por último, se remarca que no se ha hallado presencia de flavonoides en las especies analizadas.

## Gráfico 1

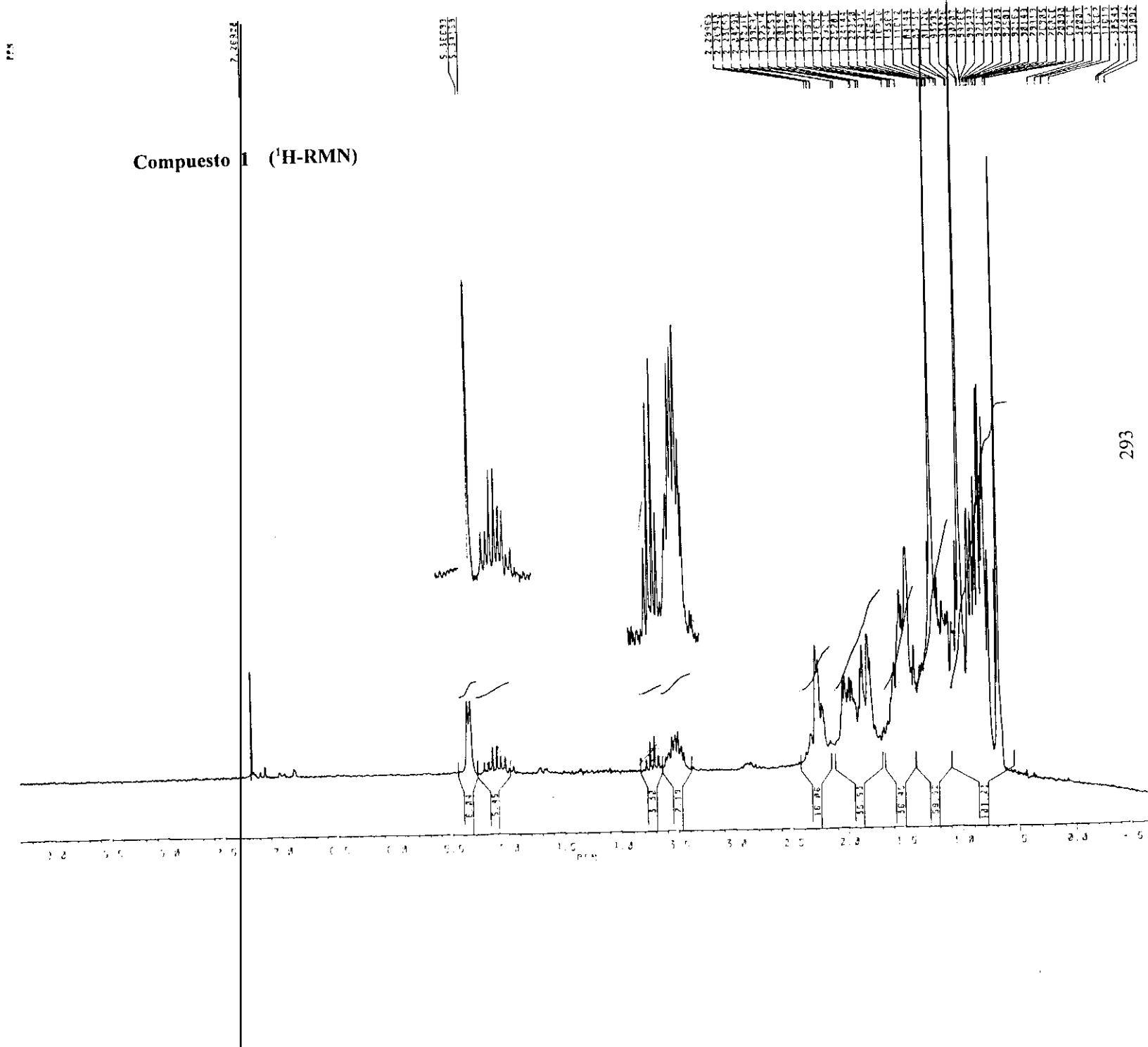




Gráfico 2

ppm

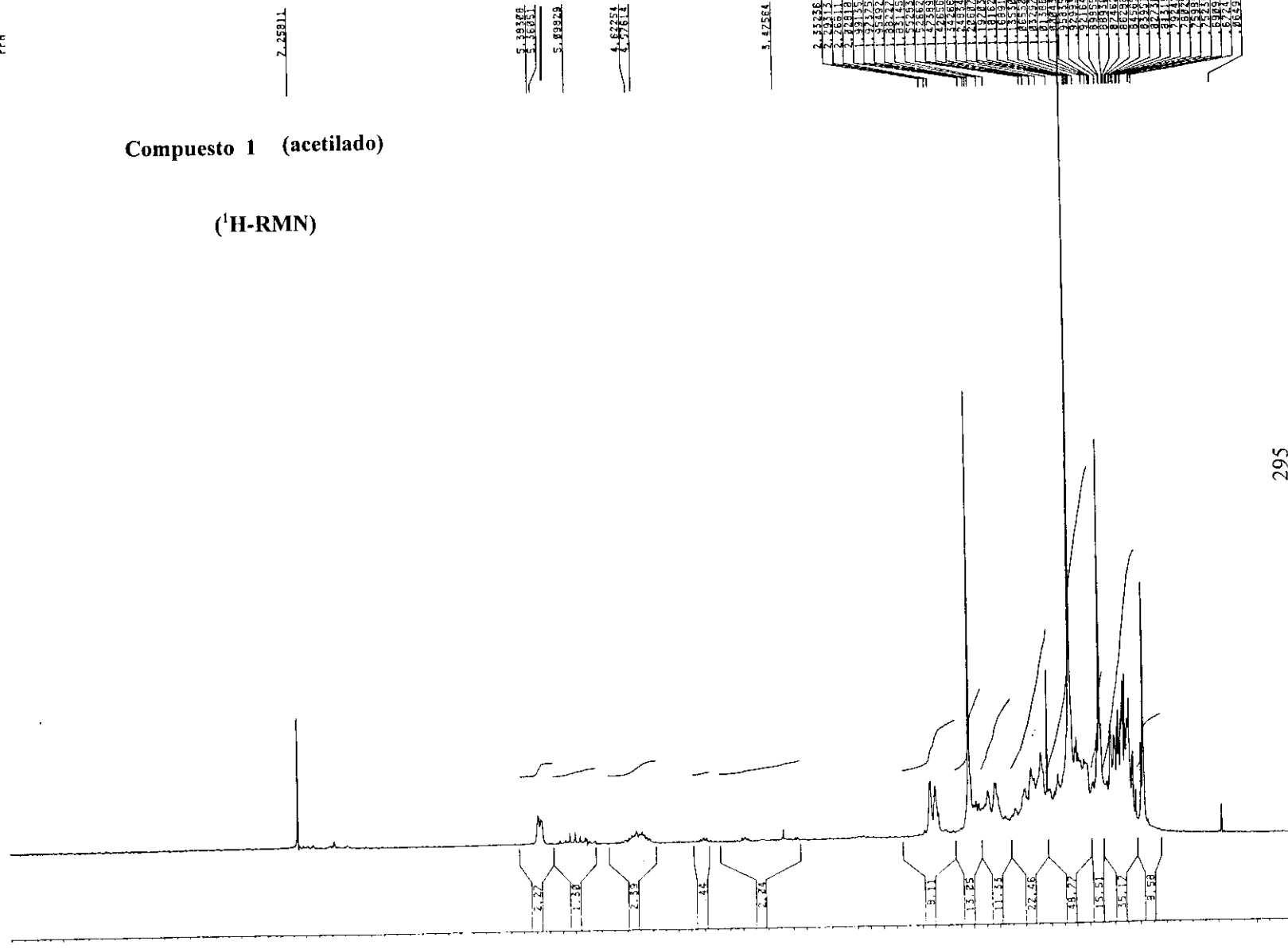






Gráfico 3

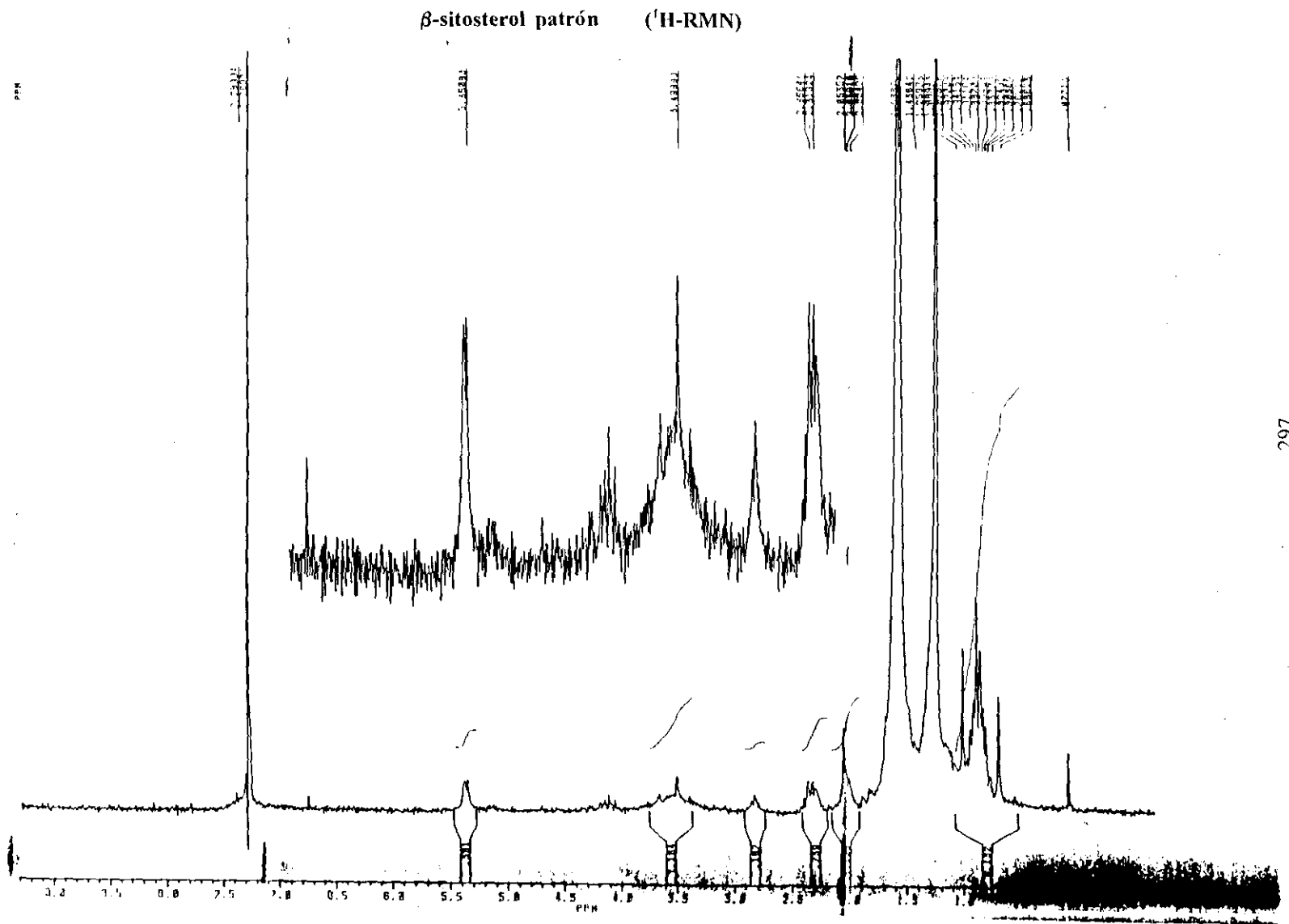




Gráfico 4

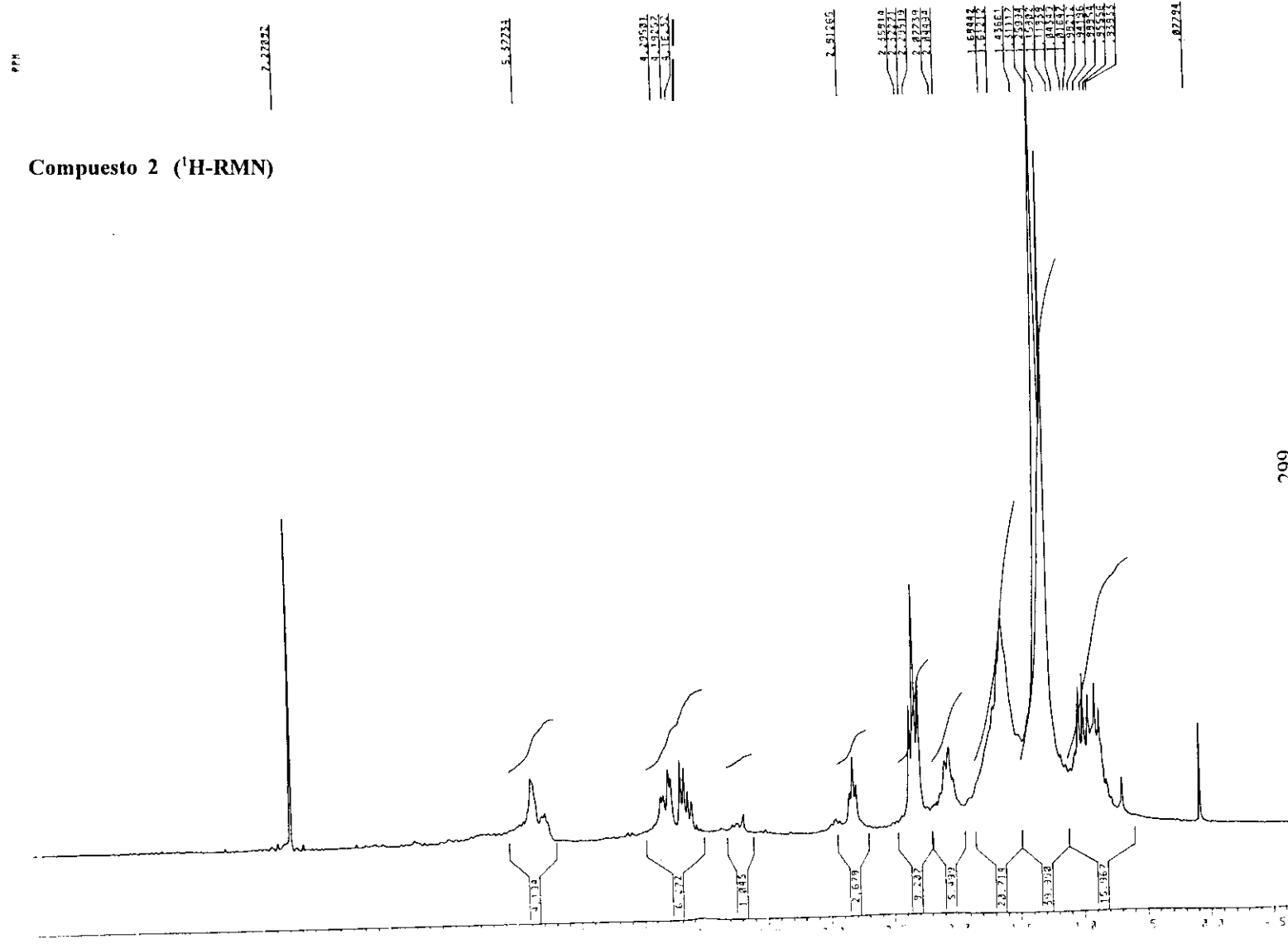




Gráfico 5

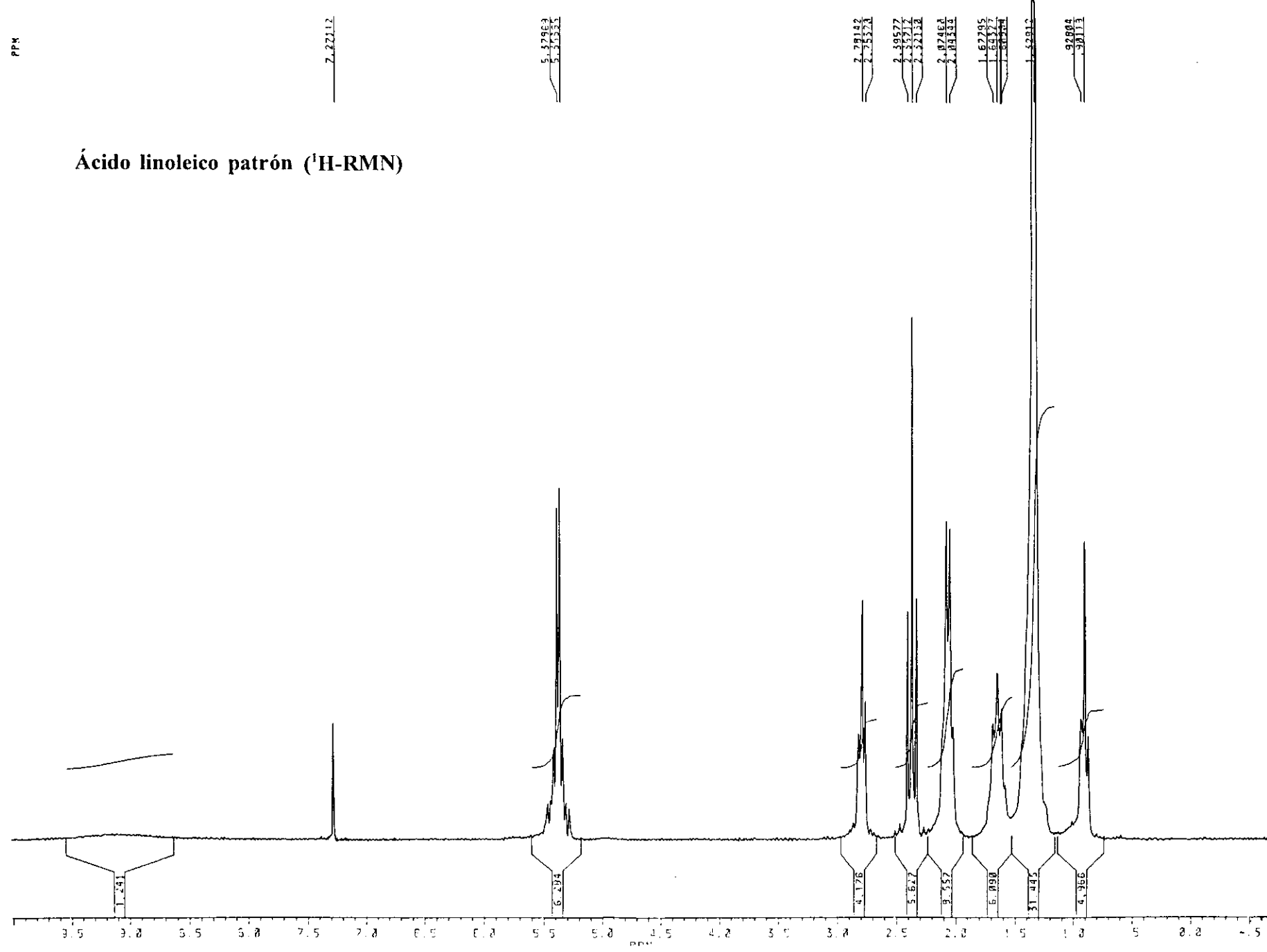






Gráfico 6

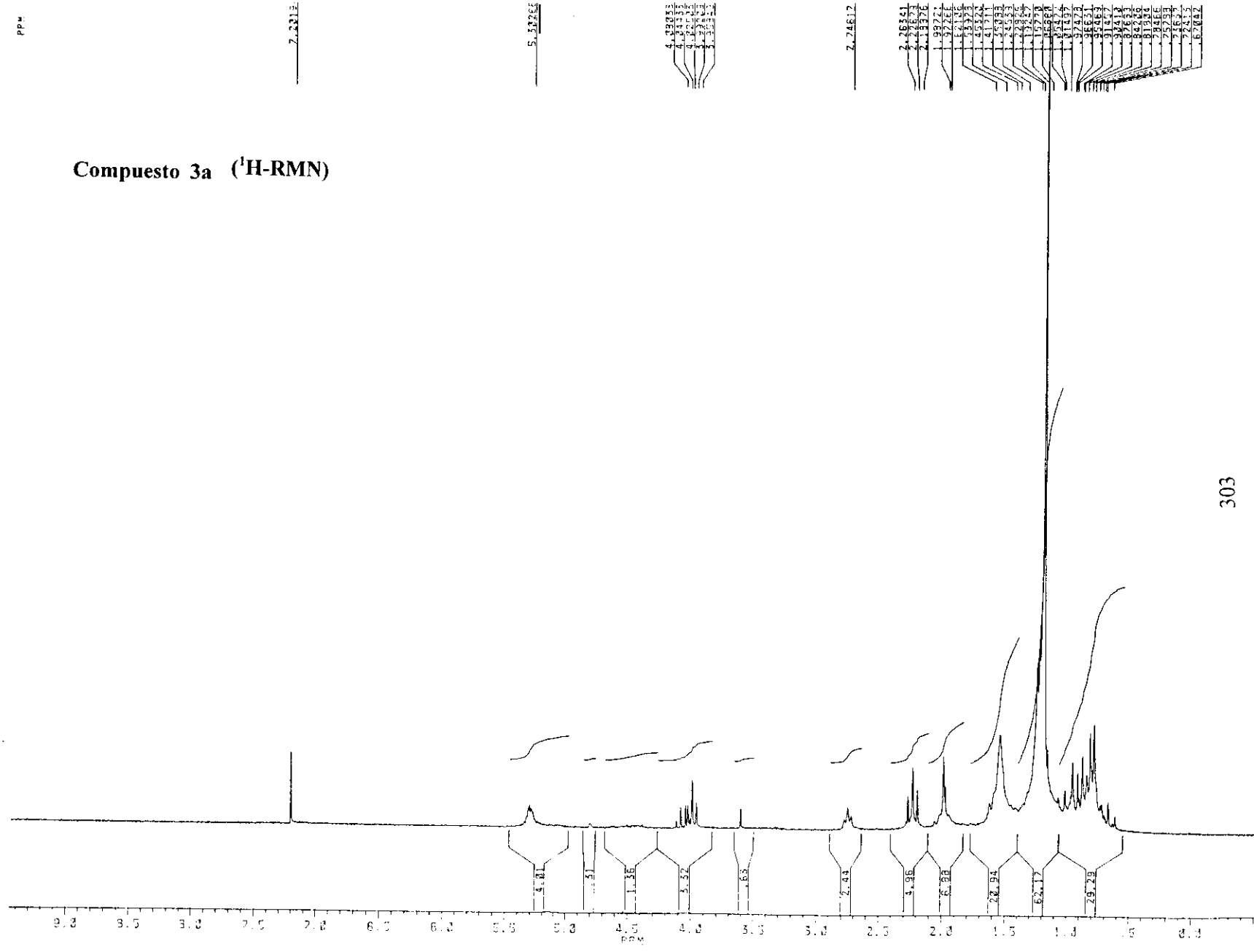
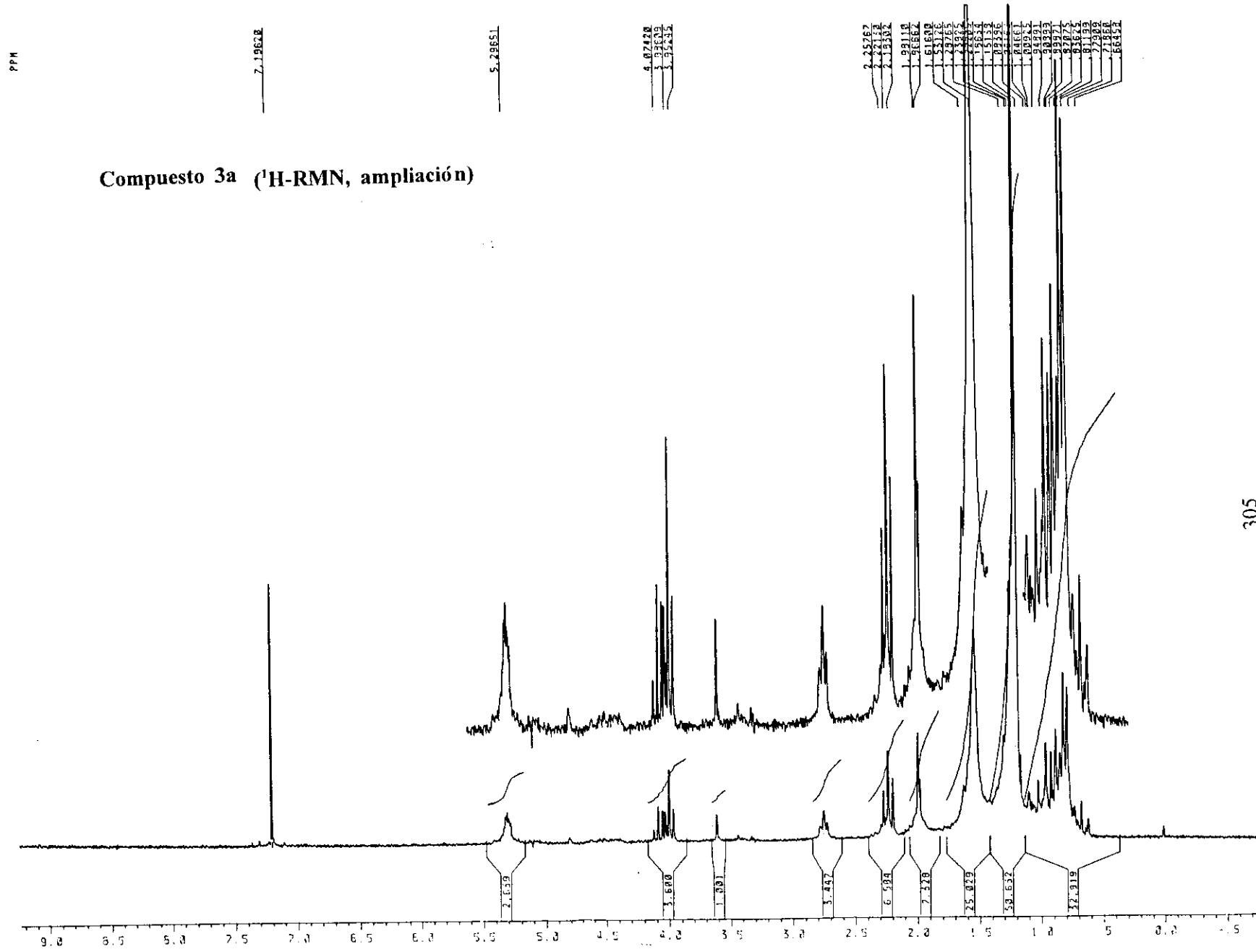


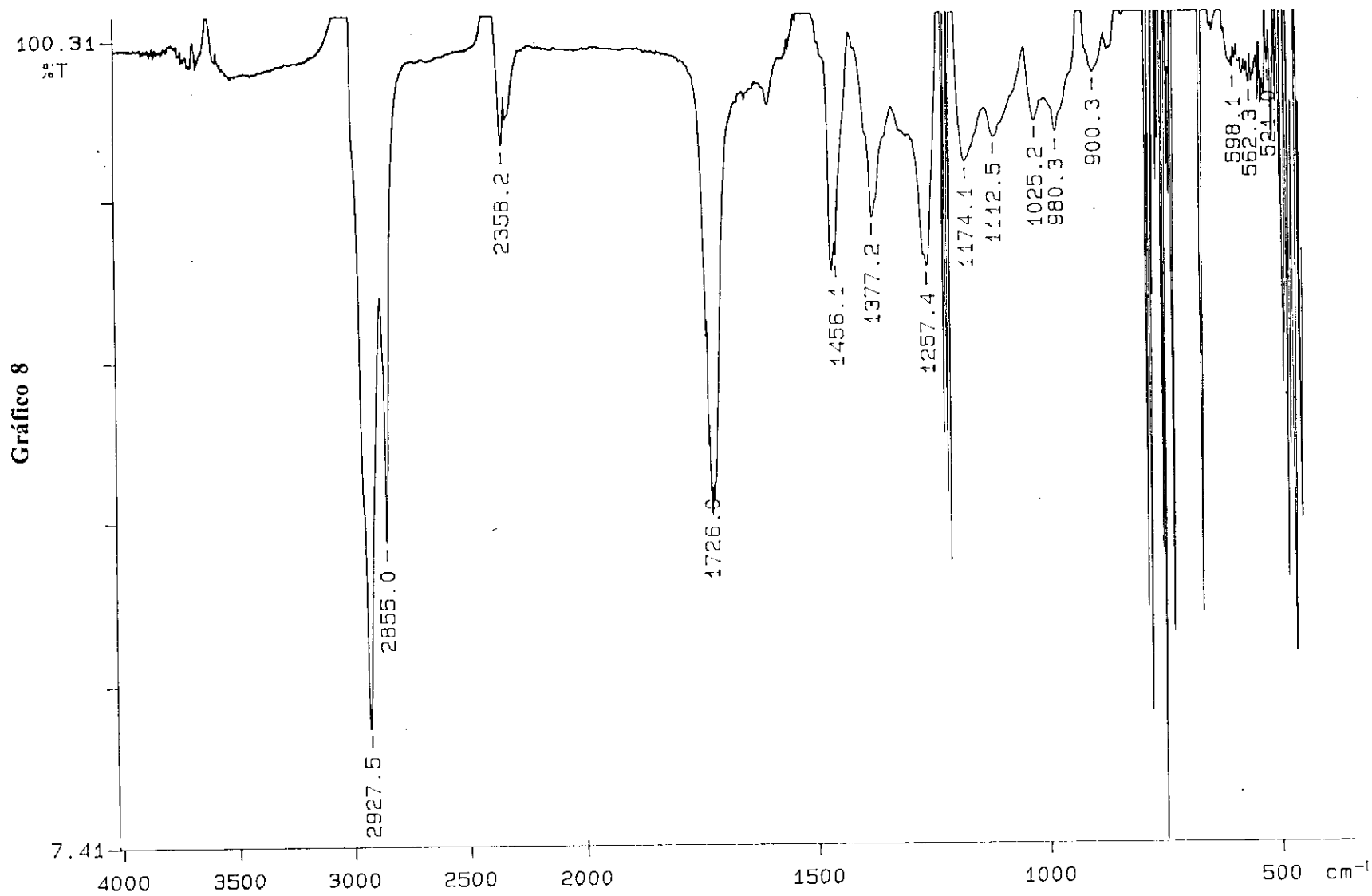


Gráfico 7





Compuesto 3a (espectroscopía infrarroja)







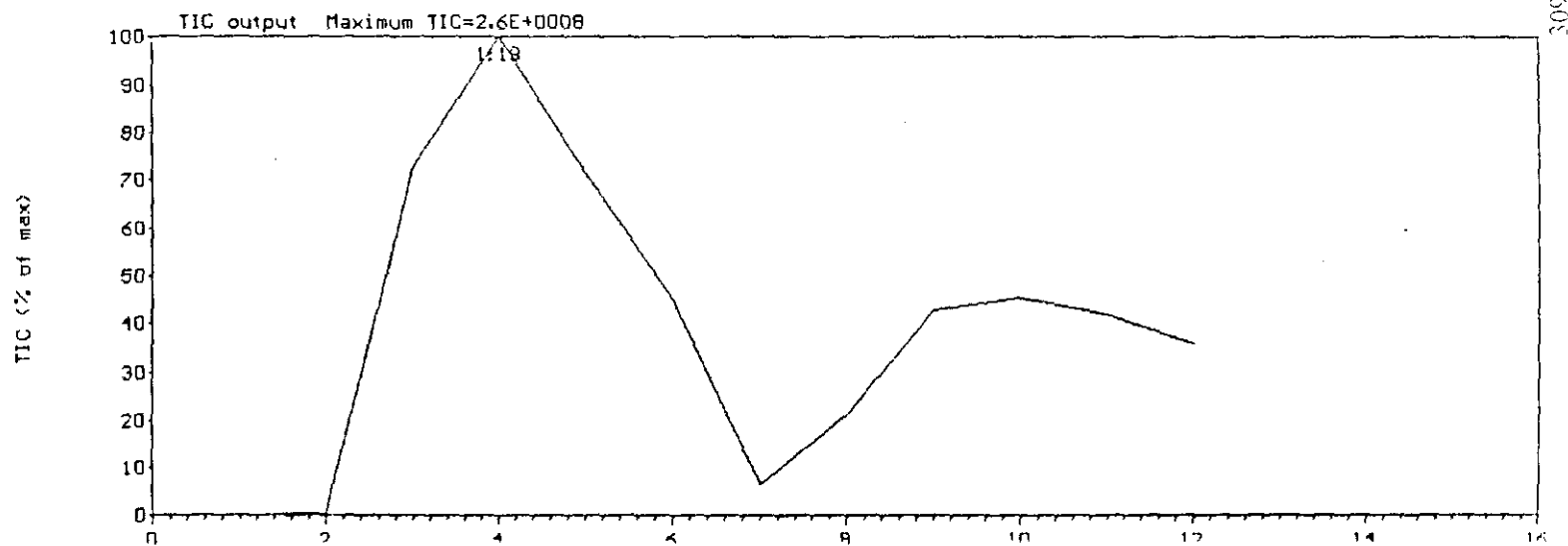
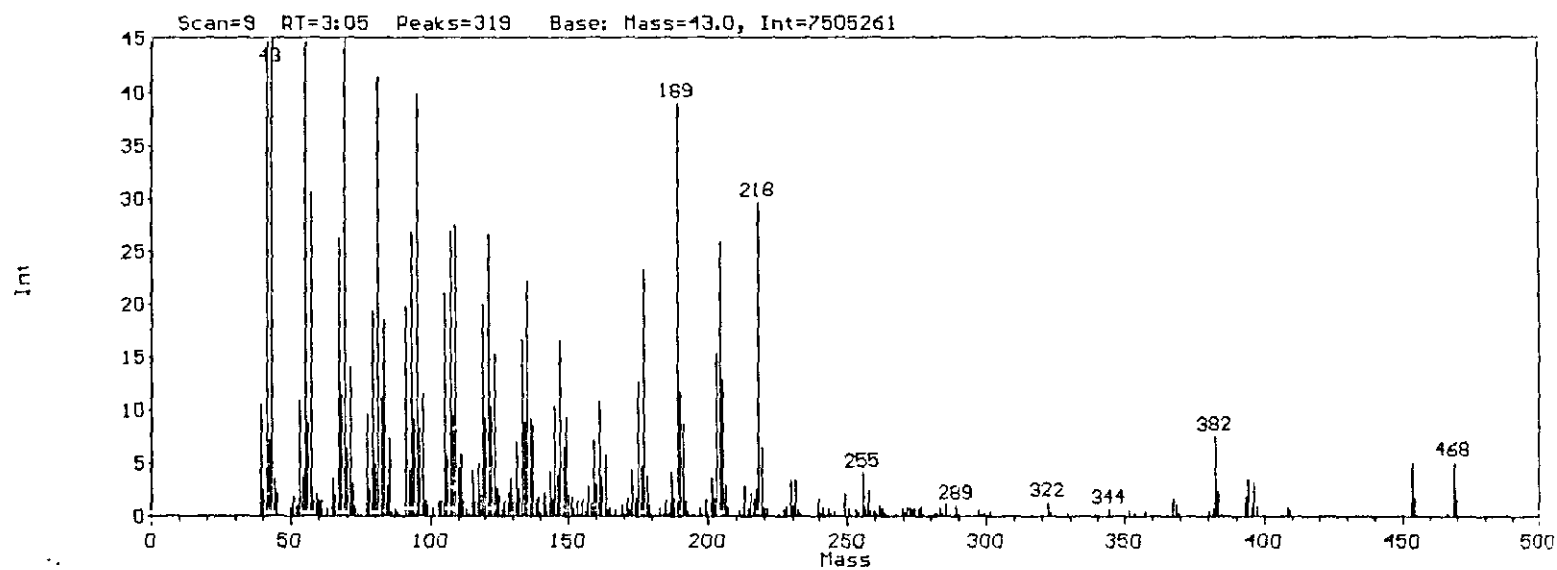
Compuesto 3a (espectrometría de masas)

E/I. 70 ev. T.F. 200C

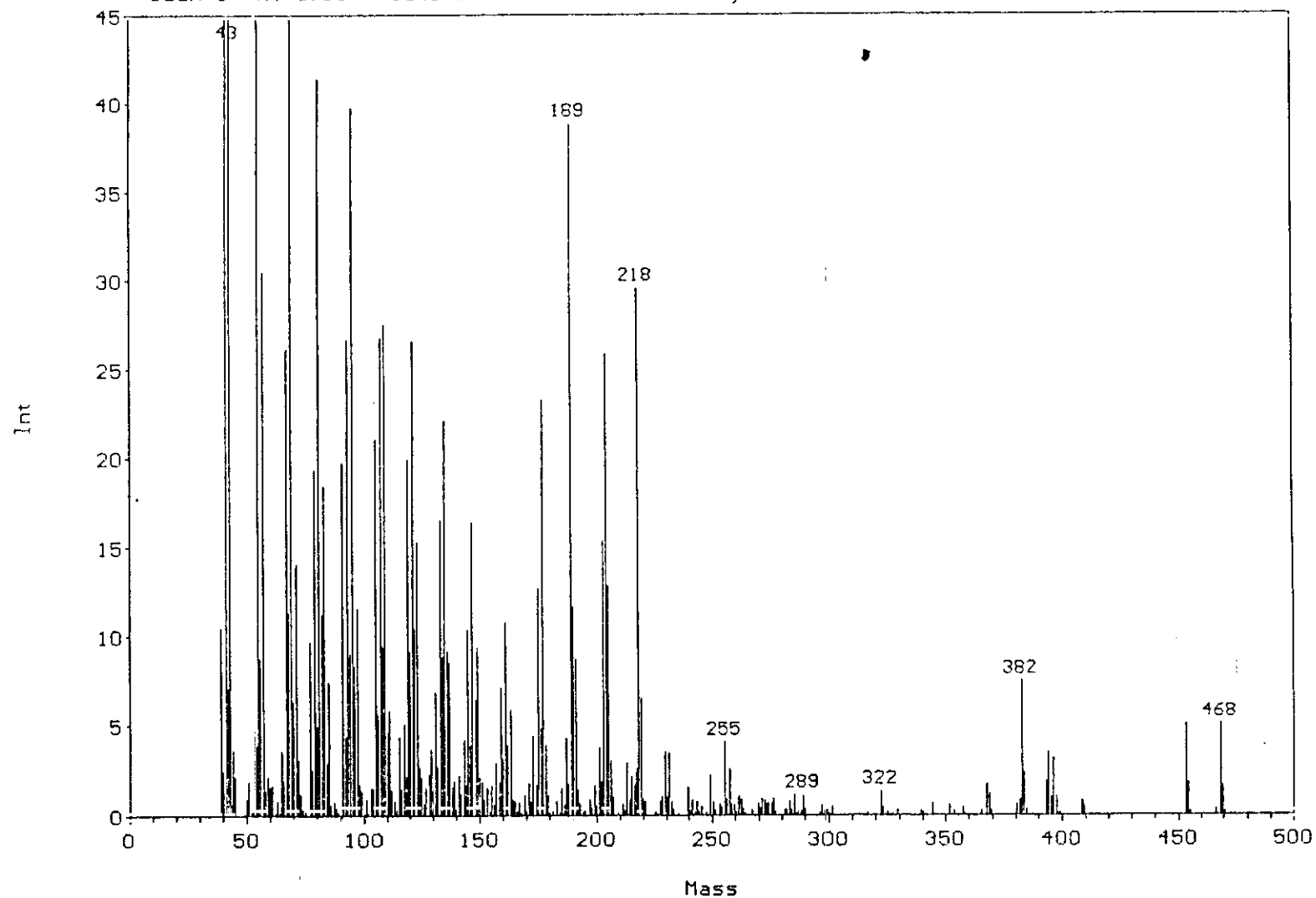
Creation Date: 7/10/1994

Time: 10:29:51

Gráfico 9



Scan=9 RT=3:05 Peaks=319 Base: Mass=43.0, Int=7505261



## (Gráfico 9)

E/I. 70 ev. T.F. 200C

Creation Date: 7/10/1994  
 Creation Time: 10:29:51

File: 8625  
 Scan number: 9  
 Total Ion Current: 112565633  
 Number of peaks: 319  
 Time from start: 0:03:05.37

| Mass  | Int    | (%)  | Width | Count   |
|-------|--------|------|-------|---------|
| 647.5 | 5316   | 0.07 | 23    | 948300  |
| 470.3 | 11034  | 0.15 | 41    | 2096957 |
| 469.4 | 123161 | 1.64 | 108   | 2104491 |
| 468.4 | 379859 | 5.06 | 127   | 2111976 |
| 467.3 | 4582   | 0.06 | 21    | 2119441 |
| 466.3 | 25335  | 0.34 | 66    | 2127070 |
| 455.3 | 10697  | 0.14 | 34    | 2210598 |
| 454.4 | 128905 | 1.72 | 105   | 2218258 |
| 453.4 | 379412 | 5.06 | 124   | 2225972 |
| 409.3 | 39140  | 0.52 | 83    | 2581471 |
| 408.4 | 58602  | 0.78 | 90    | 2590033 |
| 399.3 | 5740   | 0.08 | 23    | 2667786 |
| 398.3 | 6894   | 0.09 | 28    | 2676223 |
| 397.4 | 76501  | 1.02 | 96    | 2684806 |
| 396.4 | 241227 | 3.21 | 114   | 2693540 |
| 395.3 | 74750  | 1.00 | 94    | 2702454 |
| 394.3 | 259767 | 3.46 | 119   | 2711234 |
| 393.4 | 139767 | 1.86 | 109   | 2720130 |
| 384.3 | 24732  | 0.33 | 70    | 2800241 |
| 383.4 | 178966 | 2.38 | 113   | 2809331 |
| 382.4 | 562579 | 7.50 | 128   | 2818393 |
| 381.4 | 61418  | 0.82 | 93    | 2827581 |
| 380.3 | 47907  | 0.64 | 84    | 2836741 |
| 369.4 | 22556  | 0.30 | 66    | 2938401 |
| 368.5 | 91594  | 1.22 | 99    | 2947777 |
| 367.3 | 125279 | 1.67 | 107   | 2957289 |
| 365.3 | 16469  | 0.22 | 55    | 2976389 |
| 358.2 | 4241   | 0.06 | 18    | 3043789 |
| 357.3 | 28669  | 0.38 | 72    | 3053281 |
| 355.3 | 3913   | 0.05 | 18    | 3072787 |
| 353.4 | 19030  | 0.25 | 63    | 3091897 |
| 351.3 | 41154  | 0.55 | 83    | 3111619 |
| 345.2 | 5539   | 0.07 | 21    | 3171447 |
| 344.3 | 49621  | 0.66 | 80    | 3181572 |
| 340.3 | 15150  | 0.20 | 53    | 3221542 |
| 339.3 | 18874  | 0.25 | 60    | 3231794 |
| 329.2 | 22579  | 0.30 | 66    | 3335612 |
| 327.2 | 3938   | 0.05 | 18    | 3356452 |
| 325.2 | 14868  | 0.20 | 47    | 3377410 |
| 323.2 | 31266  | 0.42 | 80    | 3399055 |
| 322.3 | 96934  | 1.29 | 100   | 3409812 |
| 316.2 | 9903   | 0.13 | 36    | 3474898 |
| 315.2 | 4474   | 0.06 | 22    | 3485493 |
| 313.2 | 5039   | 0.07 | 21    | 3507654 |
| 311.2 | 4775   | 0.06 | 21    | 3529434 |

(Gráfico 9)

|       |        |      |     |         |
|-------|--------|------|-----|---------|
| 301.3 | 32042  | 0.43 | 81  | 3642627 |
| 300.1 | 3885   | 0.05 | 17  | 3653786 |
| 300.1 | 10092  | 0.13 | 38  | 3654275 |
| 299.3 | 24403  | 0.33 | 63  | 3665073 |
| 298.2 | 17854  | 0.24 | 59  | 3676717 |
| 297.3 | 39707  | 0.53 | 79  | 3688316 |
| 296.2 | 8811   | 0.12 | 34  | 3699996 |
| 290.2 | 28091  | 0.37 | 83  | 3770831 |
| 289.3 | 82711  | 1.10 | 109 | 3782692 |
| 288.3 | 17706  | 0.24 | 60  | 3794016 |
| 287.2 | 13070  | 0.17 | 46  | 3806212 |
| 286.3 | 8069   | 0.11 | 29  | 3818079 |
| 286.3 | 5620   | 0.07 | 21  | 3818535 |
| 286.2 | 6497   | 0.09 | 29  | 3819106 |
| 285.2 | 79643  | 1.06 | 121 | 3830911 |
| 284.3 | 22738  | 0.30 | 60  | 3842456 |
| 283.3 | 60392  | 0.80 | 96  | 3854694 |
| 282.2 | 19044  | 0.25 | 64  | 3867067 |
| 281.2 | 22716  | 0.30 | 68  | 3879351 |
| 277.1 | 11629  | 0.15 | 43  | 3928873 |
| 276.3 | 68566  | 0.91 | 106 | 3941191 |
| 275.3 | 49714  | 0.66 | 103 | 3953132 |
| 274.3 | 54585  | 0.73 | 90  | 3965638 |
| 273.3 | 48996  | 0.65 | 88  | 3978402 |
| 272.3 | 60435  | 0.81 | 90  | 3991029 |
| 271.3 | 65593  | 0.87 | 87  | 4003784 |
| 270.3 | 28089  | 0.37 | 72  | 4016663 |
| 269.3 | 48535  | 0.65 | 83  | 4029485 |
| 267.2 | 17983  | 0.24 | 64  | 4055454 |
| 264.2 | 9248   | 0.12 | 43  | 4094138 |
| 263.2 | 28937  | 0.39 | 79  | 4107371 |
| 262.2 | 65971  | 0.88 | 132 | 4120325 |
| 261.2 | 75956  | 1.01 | 99  | 4132905 |
| 260.2 | 10630  | 0.14 | 38  | 4146255 |
| 259.3 | 42313  | 0.56 | 81  | 4159616 |
| 258.2 | 45225  | 0.60 | 80  | 4173003 |
| 257.3 | 192612 | 2.57 | 110 | 4186376 |
| 256.2 | 69173  | 0.92 | 89  | 4199927 |
| 255.2 | 307477 | 4.10 | 117 | 4213416 |
| 254.2 | 33717  | 0.45 | 73  | 4227061 |
| 253.1 | 48985  | 0.65 | 81  | 4240718 |
| 251.2 | 17965  | 0.24 | 69  | 4268334 |
| 250.2 | 53919  | 0.72 | 101 | 4281947 |
| 249.2 | 164123 | 2.19 | 120 | 4295620 |
| 247.2 | 14448  | 0.19 | 49  | 4322802 |
| 245.2 | 32590  | 0.45 | 75  | 4350836 |
| 244.2 | 19301  | 0.26 | 54  | 4365005 |
| 243.2 | 59481  | 0.79 | 89  | 4379145 |
| 242.2 | 11719  | 0.16 | 41  | 4393490 |
| 241.2 | 63985  | 0.85 | 88  | 4407769 |
| 240.1 | 20350  | 0.27 | 62  | 4422151 |
| 239.2 | 117248 | 1.56 | 136 | 4436403 |
| 235.1 | 3616   | 0.05 | 17  | 4495262 |
| 233.2 | 20615  | 0.27 | 72  | 4523610 |
| 232.2 | 57374  | 0.76 | 85  | 4538281 |
| 231.2 | 260335 | 3.47 | 107 | 4553157 |
| 230.2 | 72441  | 0.97 | 92  | 4568199 |
| 229.2 | 262183 | 3.49 | 118 | 4583229 |
| 228.1 | 75226  | 1.00 | 93  | 4598423 |
| 227.2 | 57954  | 0.77 | 87  | 4613647 |
| 226.2 | 5402   | 0.07 | 24  | 4628983 |
| 225.1 | 13880  | 0.18 | 47  | 4644249 |
| 221.1 | 57086  | 0.76 | 124 | 4705582 |
| 220.2 | 65055  | 0.87 | 92  | 4720828 |
| 219.2 | 491189 | 6.34 | 126 | 4736489 |

(Gráfico 9)

|     |           |       |     |         |
|-----|-----------|-------|-----|---------|
| 1.1 | 861833 m  | 11.43 | 117 | 7571110 |
| 1.1 | 140025 m  | 1.87  | 79  | 7542456 |
| 1.1 | 627393    | 8.36  | 184 | 7577355 |
| 1.1 | 2985800   | 39.78 | 206 | 7613719 |
| 1.0 | 679132 m  | 9.05  | 117 | 7650556 |
| 1.0 | 86922 m   | 1.16  | 73  | 7651872 |
| 1.1 | 2001383   | 26.67 | 143 | 7687768 |
| 1.1 | 327166    | 4.36  | 114 | 7725541 |
| 1.1 | 1484232   | 19.78 | 143 | 7763534 |
| 1.0 | 15603     | 0.21  | 58  | 7841153 |
| 1.0 | 29100     | 0.39  | 64  | 7879729 |
| 1.1 | 50169     | 0.67  | 86  | 7919568 |
| 1.1 | 24651     | 0.33  | 68  | 7957239 |
| 1.0 | 44252     | 0.59  | 79  | 7958498 |
| 1.1 | 557730 m  | 7.43  | 115 | 7997784 |
| 1.1 | 220160 m  | 2.93  | 91  | 7999270 |
| 1.1 | 220560 m  | 2.94  | 99  | 8039110 |
| 1.1 | 112955 m  | 1.50  | 89  | 8040546 |
| 1.1 | 1383739 m | 18.44 | 128 | 8080845 |
| 1.1 | 148242 m  | 1.98  | 86  | 8082349 |
| 1.1 | 841909    | 11.22 | 198 | 8123243 |
| 1.1 | 3108421 m | 41.42 | 144 | 8165949 |
| 1.1 | 75612 m   | 1.01  | 79  | 8167532 |
| 1.1 | 373069    | 4.97  | 116 | 8209418 |
| 1.1 | 1453966   | 19.37 | 138 | 8253328 |
| 1.0 | 191567    | 2.55  | 114 | 8297883 |
| 1.1 | 727119    | 9.69  | 135 | 8342911 |
| 1.0 | 13730     | 0.18  | 49  | 8434223 |
| 1.0 | 20684     | 0.28  | 66  | 8481173 |
| 1.0 | 3860      | 0.05  | 18  | 8481944 |
| 1.0 | 43709     | 0.58  | 75  | 8527059 |
| 1.0 | 86550     | 1.15  | 94  | 8528633 |
| 1.0 | 50139 m   | 0.67  | 76  | 8573711 |
| 1.0 | 228787 m  | 3.05  | 111 | 8575235 |
| 1.1 | 1049411 m | 13.98 | 130 | 8622381 |
| 1.1 | 512583 m  | 6.93  | 108 | 8624156 |
| 1.1 | 482037    | 6.42  | 128 | 8672117 |
| 1.0 | 68246     | 0.91  | 87  | 8673857 |
| 1.1 | 3891202 m | 51.85 | 153 | 8722375 |
| 1.1 | 99304 m   | 1.32  | 91  | 8724167 |
| 1.9 | 847051    | 11.29 | 144 | 8773511 |
| 1.9 | 6062      | 0.08  | 25  | 8775406 |
| 1.1 | 1960254   | 26.12 | 148 | 8825434 |
| 1.0 | 147485    | 1.97  | 101 | 8878223 |
| 1.0 | 270312    | 3.60  | 110 | 8931707 |
| 1.0 | 7141      | 0.10  | 28  | 8986120 |
| 1.0 | 54929     | 0.73  | 80  | 9041472 |
| 1.0 | 7939      | 0.11  | 29  | 9097786 |
| 1.0 | 125160    | 1.67  | 101 | 9153586 |
| 1.0 | 116500    | 1.55  | 97  | 9211706 |
| 1.0 | 160302    | 2.14  | 106 | 9268649 |
| 1.1 | 84703     | 1.13  | 89  | 9326891 |
| 1.0 | 103034    | 1.37  | 96  | 9328816 |
| 1.0 | 2286207 m | 30.46 | 153 | 9387726 |
| 1.0 | 315892 m  | 4.21  | 122 | 9389949 |
| 1.0 | 663871    | 8.85  | 143 | 9450042 |
| 1.0 | 12033     | 0.16  | 45  | 9452316 |
| 1.0 | 4252760   | 58.00 | 162 | 9513373 |
| 1.0 | 206581    | 2.75  | 115 | 9515717 |
| 1.0 | 295233    | 3.93  | 117 | 9578052 |
| 1.0 | 807695    | 10.78 | 139 | 9643885 |
| 1.0 | 73905     | 0.98  | 84  | 9711123 |
| 1.0 | 141983    | 1.99  | 105 | 9779545 |
| 1.0 | 66601     | 0.89  | 83  | 9849508 |
| 1.2 | 4712      | 0.06  | 12  | 9929292 |

(Gráfico 9)

|       |          |       |     |         |
|-------|----------|-------|-----|---------|
| 154.0 | 12404    | 0.17  | 50  | 5948854 |
| 153.1 | 109580   | 1.46  | 184 | 5970432 |
| 152.1 | 67957    | 0.31  | 184 | 5992963 |
| 151.1 | 141618   | 1.89  | 140 | 6015207 |
| 150.1 | 154925   | 2.06  | 126 | 6038089 |
| 149.1 | 702517   | 9.36  | 152 | 6061172 |
| 149.0 | 85960    | 1.14  | 87  | 6083626 |
| 148.1 | 482892   | 6.43  | 119 | 6084479 |
| 147.1 | 1231893  | 16.41 | 152 | 6107982 |
| 146.1 | 291711   | 3.89  | 123 | 6131649 |
| 145.1 | 774819   | 10.32 | 138 | 6155466 |
| 144.1 | 126926   | 1.69  | 105 | 6179463 |
| 143.1 | 315238   | 4.20  | 120 | 6203608 |
| 142.0 | 91990    | 1.23  | 101 | 6227920 |
| 141.1 | 166707   | 2.22  | 203 | 6251996 |
| 140.0 | 29158    | 0.39  | 102 | 6275303 |
| 139.1 | 140178   | 1.87  | 135 | 6300471 |
| 138.0 | 117679   | 1.57  | 127 | 6324936 |
| 137.1 | 640436   | 8.53  | 178 | 6350082 |
| 136.1 | 690234   | 9.20  | 146 | 6375397 |
| 135.0 | 1658525  | 22.10 | 169 | 6400984 |
| 134.1 | 661799   | 8.82  | 128 | 6426792 |
| 133.1 | 1240016  | 16.52 | 147 | 6452715 |
| 132.0 | 197831   | 2.64  | 107 | 6478983 |
| 131.0 | 521869   | 6.95  | 123 | 6505303 |
| 130.0 | 119893   | 1.60  | 101 | 6531908 |
| 129.0 | 271480   | 3.62  | 127 | 6558659 |
| 128.0 | 169888   | 2.26  | 142 | 6585615 |
| 127.0 | 117095 m | 1.56  | 151 | 6611194 |
| 127.0 | 43278 m  | 0.58  | 81  | 6612916 |
| 126.0 | 50015    | 0.67  | 121 | 6638295 |
| 125.0 | 153410 m | 2.04  | 85  | 6665560 |
| 125.0 | 71255 m  | 0.35  | 73  | 6666615 |
| 124.1 | 200772   | 2.68  | 138 | 6693548 |
| 123.1 | 1144981  | 15.26 | 174 | 6721543 |
| 122.0 | 783734   | 10.44 | 151 | 6749892 |
| 121.1 | 1993643  | 28.56 | 179 | 6778425 |
| 120.0 | 688498   | 9.17  | 125 | 6807241 |
| 119.0 | 1492289  | 19.98 | 142 | 6836262 |
| 118.1 | 160290   | 2.14  | 101 | 6865647 |
| 117.1 | 383353   | 5.09  | 123 | 6895192 |
| 116.0 | 112758   | 1.50  | 116 | 6924967 |
| 115.1 | 329604   | 4.39  | 143 | 6954835 |
| 114.0 | 21010    | 0.28  | 64  | 6985168 |
| 113.1 | 56978 m  | 0.76  | 88  | 7013307 |
| 113.1 | 52998 m  | 0.71  | 121 | 7014979 |
| 112.0 | 108179   | 1.44  | 144 | 7044574 |
| 111.1 | 442289 m | 5.89  | 103 | 7075325 |
| 111.1 | 125622 m | 1.67  | 67  | 7076490 |
| 110.1 | 348176   | 4.64  | 159 | 7106942 |
| 109.0 | 2063417  | 27.49 | 189 | 7138524 |
| 108.1 | 706632   | 9.42  | 144 | 7170561 |
| 107.1 | 2008937  | 29.77 | 180 | 7202973 |
| 106.1 | 426826   | 5.29  | 118 | 7235583 |
| 105.0 | 1582591  | 21.09 | 146 | 7268472 |
| 104.1 | 109994   | 1.47  | 98  | 7301795 |
| 103.1 | 109851   | 1.46  | 108 | 7335418 |
| 102.0 | 14684    | 0.20  | 55  | 7369445 |
| 101.1 | 65684    | 0.88  | 81  | 7403046 |
| 100.1 | 5949     | 0.08  | 25  | 7436464 |
| 100.0 | 4472     | 0.06  | 21  | 7437689 |
| 99.1  | 98298 m  | 1.28  | 29  | 7470124 |
| 99.1  | 70208 m  | 0.94  | 87  | 7471453 |
| 99.1  | 32218 m  | 0.48  | 24  | 7472869 |
| 98.0  | 112542 m | 1.22  | 62  | 7505511 |
| 98.0  | 124782 m | 1.62  | 61  | 7506622 |

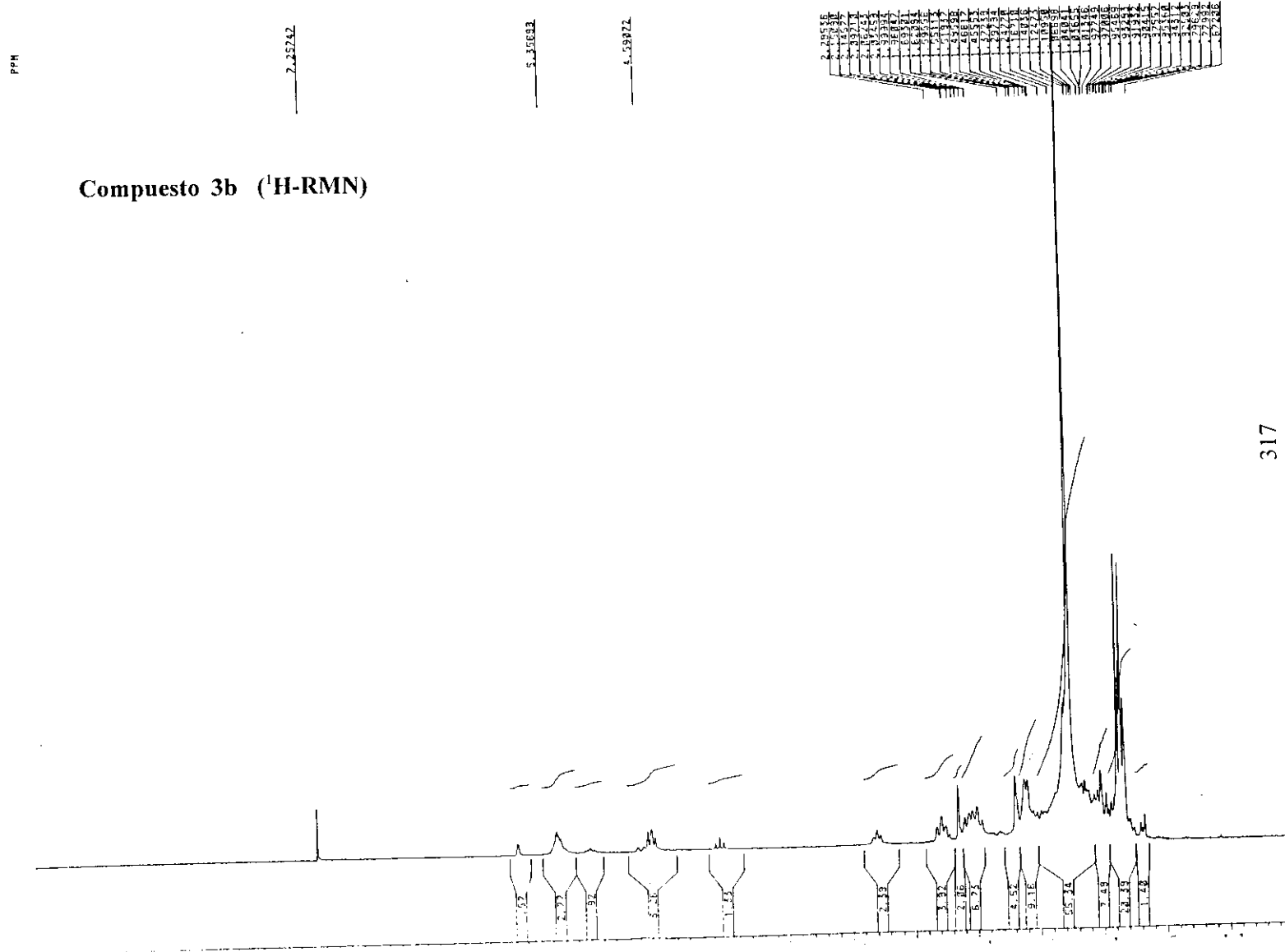


(Gráfico 9)

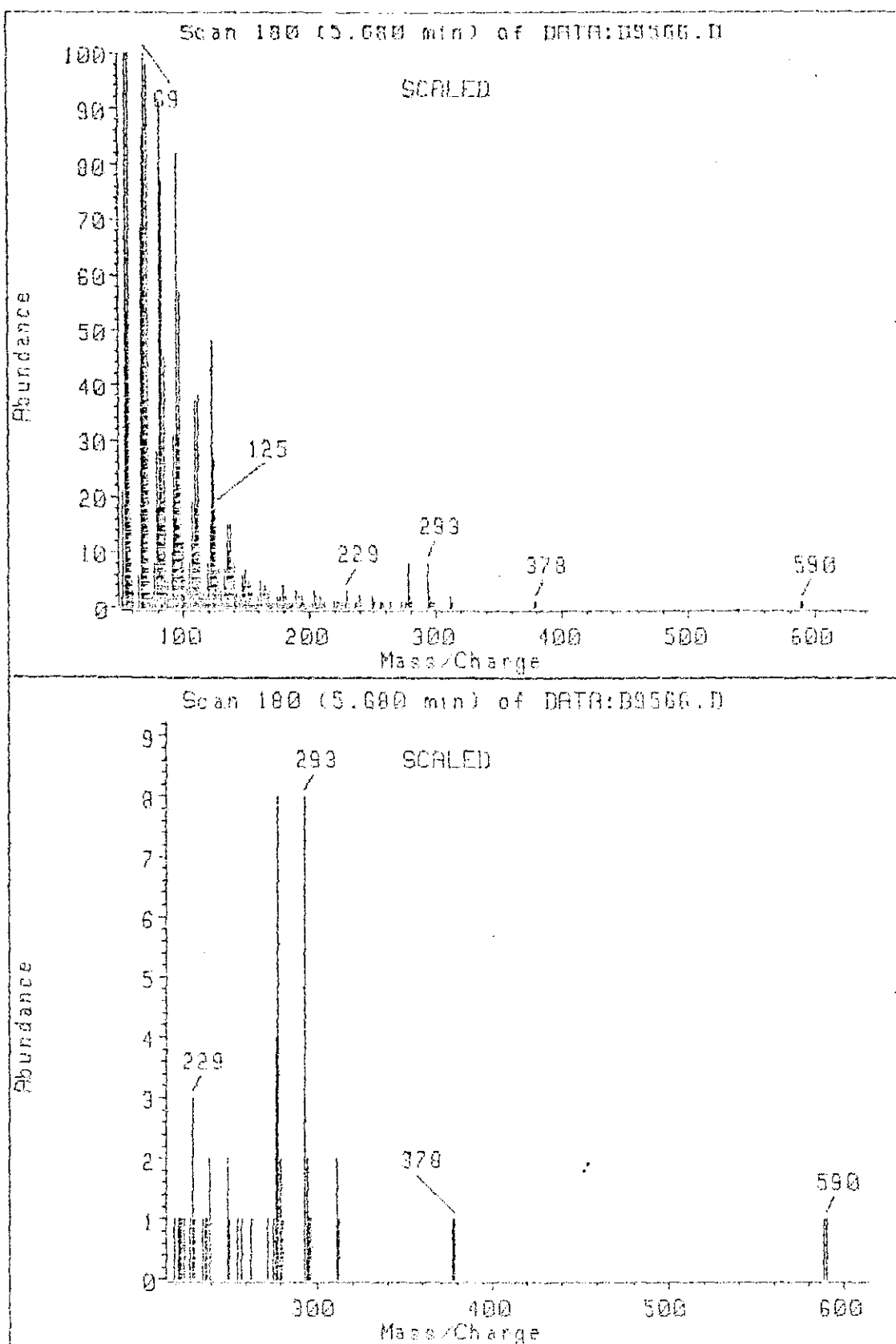
|      |           |        |     |                  |
|------|-----------|--------|-----|------------------|
| 45.0 | 161989    | 2.13   | 114 | 10217374         |
| 45.0 | 87913     | 0.30   | 78  | 10220724         |
| 44.0 | 129519    | 1.73   | 105 | 10294845         |
| 44.0 | 271339    | 3.62   | 144 | 10297569         |
| 43.9 | 43759     | 0.58   | 66  | 10300385         |
| 43.0 | 4316768 m | 57.52  | 170 | 10375886         |
| 43.0 | 7505261 m | 100.00 | 198 | 10378246 ** BASE |
| 42.0 | 534802    | 7.13   | 148 | 10459446         |
| 42.0 | 81251     | 1.08   | 93  | 10462415         |
| 41.0 | 4259757   | 56.76  | 161 | 10544836         |
| 40.0 | 187485    | 2.50   | 116 | 10632551         |
| 39.9 | 767119    | 10.49  | 136 | 10722481         |



Gráfico 10







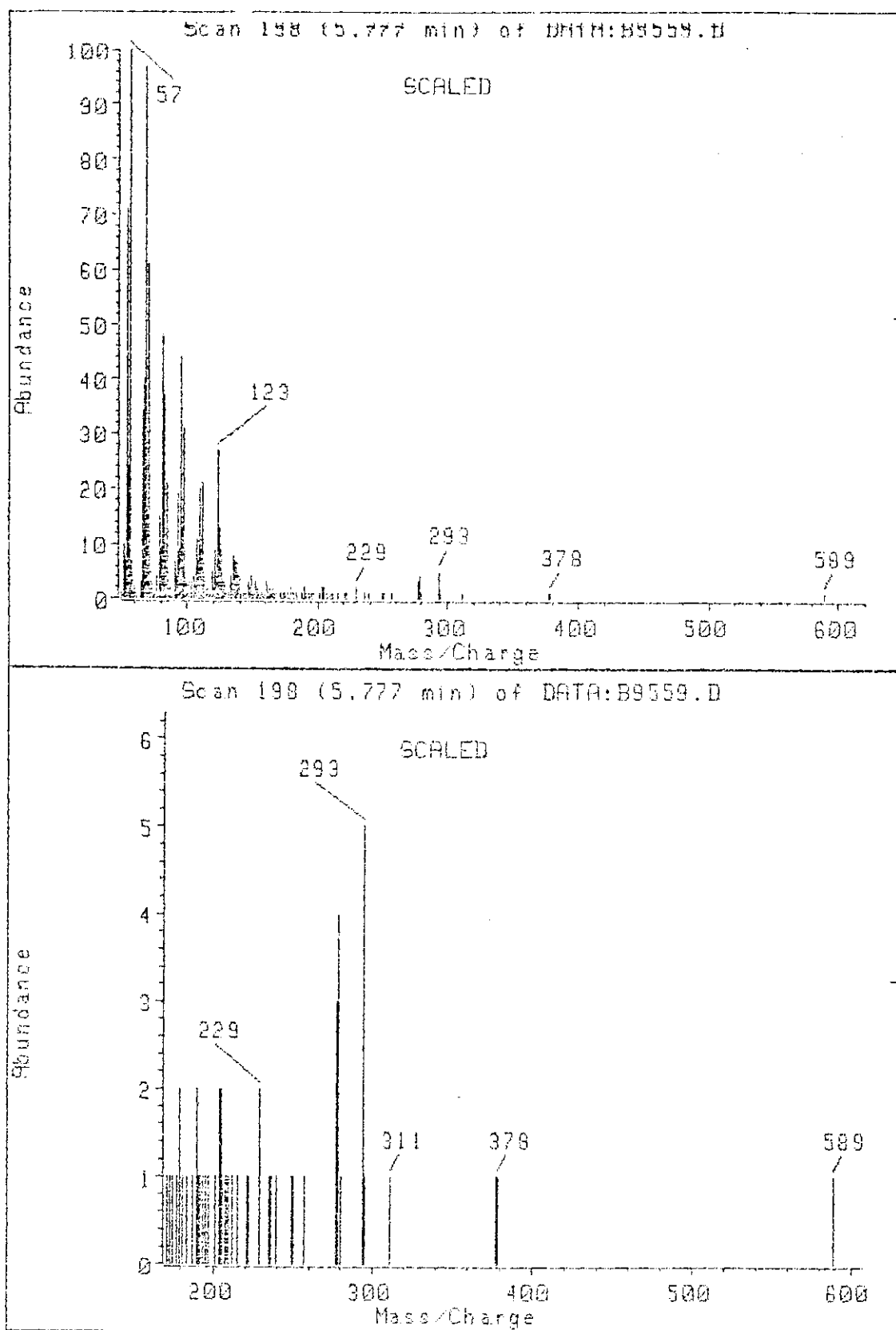
(Gráfico 11)

Scan 180 (5.680 min) of DATA:D9506.D

E/I 70 E.V. TEMP.F.2000 13-X-04

| m/z   | abund. | m/z    | abund. | m/z    | abund. | m/z    | abund. |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 51.05 | 2      | 100.00 | 5      | 142.25 | 1      | 187.10 | 1      |
| 53.05 | 21     | 101.10 | 5      | 143.05 | 1      | 188.20 | 1      |
| 55.05 | 100    | 102.20 | 1      | 144.05 | 1      | 189.20 | 3      |
| 56.05 | 53     | 103.00 | 4      | 145.05 | 2      | 190.10 | 1      |
| 57.05 | 100    | 105.00 | 8      | 146.05 | 1      | 191.20 | 2      |
| 57.95 | 17     | 106.10 | 4      | 147.05 | 6      | 192.20 | 1      |
| 59.05 | 5      | 107.00 | 10     | 148.05 | 4      | 193.20 | 2      |
| 59.95 | 3      | 108.10 | 11     | 149.05 | 7      | 194.20 | 1      |
| 60.95 | 2      | 109.00 | 37     | 150.05 | 2      | 195.20 | 1      |
| 65.05 | 6      | 110.10 | 18     | 151.15 | 5      | 196.20 | 1      |
| 67.05 | 63     | 111.00 | 38     | 152.05 | 5      | 197.20 | 1      |
| 68.05 | 85     | 112.00 | 6      | 153.05 | 4      | 199.20 | 1      |
| 69.05 | 100    | 113.00 | 8      | 154.15 | 2      | 201.10 | 1      |
| 70.05 | 37     | 114.00 | 2      | 155.05 | 3      | 202.20 | 1      |
| 71.05 | 38     | 114.90 | 3      | 156.05 | 1      | 203.10 | 3      |
| 72.05 | 9      | 116.00 | 1      | 157.05 | 1      | 204.20 | 2      |
| 73.00 | 5      | 117.00 | 2      | 158.15 | 1      | 205.10 | 1      |
| 74.00 | 1      | 118.00 | 8      | 159.15 | 2      | 207.10 | 1      |
| 75.00 | 2      | 120.10 | 4      | 161.05 | 5      | 208.20 | 2      |
| 77.00 | 8      | 121.00 | 15     | 162.15 | 1      | 209.10 | 1      |
| 79.00 | 28     | 122.15 | 10     | 163.05 | 3      | 211.20 | 1      |
| 80.20 | 18     | 123.05 | 48     | 164.05 | 1      | 219.15 | 1      |
| 81.10 | 31     | 124.05 | 27     | 165.05 | 4      | 221.25 | 1      |
| 82.10 | 62     | 125.05 | 18     | 166.15 | 2      | 222.25 | 1      |
| 83.10 | 77     | 126.05 | 6      | 167.15 | 3      | 223.25 | 1      |
| 84.10 | 19     | 127.05 | 7      | 168.05 | 1      | 224.35 | 1      |
| 85.10 | 45     | 128.05 | 2      | 169.15 | 1      | 228.15 | 1      |
| 86.00 | 5      | 129.05 | 3      | 170.10 | 1      | 229.15 | 3      |
| 87.10 | 5      | 130.15 | 1      | 171.10 | 1      | 230.25 | 1      |
| 88.00 | 3      | 131.05 | 2      | 173.10 | 1      | 235.25 | 1      |
| 89.00 | 2      | 132.15 | 1      | 175.10 | 2      | 236.25 | 1      |
| 91.00 | 10     | 133.05 | 7      | 176.10 | 1      | 237.15 | 1      |
| 92.20 | 6      | 134.05 | 5      | 177.10 | 2      | 239.25 | 2      |
| 93.10 | 31     | 135.05 | 15     | 179.20 | 1      | 249.25 | 2      |
| 94.10 | 20     | 136.05 | 10     | 179.10 | 4      | 250.25 | 1      |
| 95.00 | 82     | 137.05 | 15     | 180.20 | 1      | 255.15 | 1      |
| 96.10 | 31     | 138.05 | 8      | 181.20 | 2      | 257.25 | 1      |
| 97.00 | 57     | 139.05 | 8      | 182.20 | 1      | 263.25 | 1      |
| 98.10 | 12     | 140.05 | 2      | 183.20 | 1      | 272.30 | 1      |
| 99.10 | 12     | 141.05 | 3      | 185.20 | 1      | 275.40 | 1      |





## (Gráfico 12)

Scan 198 (5.777 min) of DATA:B0558.D

E/I 70 E.V. TEMP. F. 2000 10-X-94

| m/z   | abund. | m/z    | abund. | m/z    | abund. | m/z    | abund. |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 50.05 | 1      | 96.10  | 14     | 135.05 | 7      | 187.10 | 1      |
| 53.05 | 10     | 97.10  | 31     | 137.05 | 7      | 189.20 | 2      |
| 54.05 | 7      | 98.10  | 6      | 138.15 | 4      | 190.20 | 1      |
| 55.05 | 71     | 99.10  | 5      | 139.05 | 4      | 191.10 | 1      |
| 56.05 | 24     | 100.10 | 3      | 140.05 | 1      | 193.20 | 1      |
| 57.05 | 100    | 101.00 | 3      | 141.05 | 1      | 195.30 | 1      |
| 58.05 | 7      | 103.00 | 3      | 143.05 | 1      | 196.30 | 1      |
| 59.05 | 1      | 105.10 | 4      | 145.05 | 1      | 201.20 | 1      |
| 59.95 | 2      | 106.10 | 2      | 147.05 | 3      | 203.20 | 2      |
| 60.95 | 1      | 107.00 | 11     | 148.15 | 2      | 204.20 | 2      |
| 64.05 | 3      | 108.10 | 7      | 149.05 | 4      | 205.20 | 1      |
| 67.05 | 34     | 109.10 | 20     | 150.15 | 1      | 207.10 | 1      |
| 68.05 | 40     | 110.10 | 9      | 151.05 | 2      | 208.20 | 1      |
| 69.05 | 97     | 111.00 | 21     | 152.05 | 3      | 209.10 | 1      |
| 70.05 | 17     | 112.10 | 3      | 153.05 | 2      | 211.20 | 1      |
| 71.05 | 61     | 113.00 | 4      | 154.15 | 1      | 215.10 | 1      |
| 72.05 | 5      | 114.10 | 1      | 155.05 | 1      | 221.25 | 1      |
| 73.00 | 3      | 115.00 | 2      | 156.05 | 1      | 222.15 | 1      |
| 75.10 | 1      | 117.00 | 1      | 157.15 | 1      | 229.15 | 2      |
| 77.00 | 4      | 119.00 | 5      | 159.05 | 1      | 235.45 | 1      |
| 79.10 | 15     | 120.20 | 2      | 159.95 | 1      | 236.15 | 1      |
| 80.10 | 9      | 121.00 | 9      | 161.15 | 3      | 239.25 | 1      |
| 81.10 | 48     | 122.15 | 5      | 162.15 | 1      | 249.25 | 1      |
| 82.10 | 29     | 123.15 | 27     | 163.15 | 2      | 250.35 | 1      |
| 83.10 | 37     | 124.15 | 13     | 165.15 | 2      | 257.25 | 1      |
| 84.10 | 8      | 125.15 | 10     | 166.15 | 1      | 277.30 | 3      |
| 85.10 | 21     | 126.15 | 3      | 167.05 | 1      | 278.30 | 4      |
| 86.10 | 2      | 127.05 | 3      | 171.10 | 1      | 279.30 | 1      |
| 87.10 | 2      | 128.15 | 1      | 173.10 | 1      | 293.30 | 5      |
| 88.00 | 1      | 129.05 | 1      | 175.20 | 1      | 294.30 | 1      |
| 91.10 | 7      | 130.05 | 1      | 177.20 | 1      | 311.50 | 1      |
| 92.10 | 4      | 133.05 | 4      | 179.20 | 2      | 377.60 | 1      |
| 93.10 | 19     | 134.15 | 3      | 181.20 | 1      | 378.40 | 1      |
| 94.10 | 9      | 135.05 | 8      | 183.10 | 1      | 586.70 | 1      |
| 95.10 | 44     |        |        |        |        |        |        |

## FITOQUÍMICA: DISCUSIÓN

Al haber elegido como objeto de estudio los compuestos mayoritarios comunes a las 10 especies, parece evidente que no se va a encontrar un marcador taxonómico que permita diferenciarlas. En todo caso, se puede discutir el valor de estas sustancias como caracterizadoras del grupo estudiado, así como su posible papel biológico en éste.

Los dos compuestos estructuralmente identificados ( $\beta$ -sitosterol y ácido linoleico) se han descrito como de presencia generalizada en briófitos, así como en plantas vasculares, por lo que no manifiestan utilidad alguna para distinguir la sección *Trichophyllae*.

El  $\beta$ -sitosterol es un componente habitual en membrana citoplásmica y plastidial (Bailey & Northcote 1976). Muchas veces se encuentra asociado a lipoproteínas, entre ellas el fitocromo. Aunque su papel se desconoce en briófitos, en plantas vasculares su concentración se incrementa para aumentar el grosor de las membranas, como respuesta a condiciones de bajas temperaturas, especialmente de daño mecánico por hielo (Harwood 1980). En este caso podría pensarse que la abundancia con que se ha encontrado se debe al método de conservación del material (en congelación). Sin embargo, dado que las bajas temperaturas se aplicaron sobre material deshidratado, y que posteriormente no volvió a rehidratarse, no parece probable que los musgos pudieran alcanzar el grado de actividad metabólica necesario para la síntesis y acumulación de este componente. Además, en otros musgos se ha encontrado igualmente en altas proporciones.

Para no limitar las sugerencias sobre su posible papel en este grupo de musgos a extrapolaciones de lo conocido en plantas vasculares, sería necesario investigar la localización de este compuesto en la célula (pues podría formar parte de los acúmulos lipídicos observados), su actividad biológica, y profundizar en la relación entre su concentración y las condiciones ambientales.

Por otro lado, aunque habría que estudiar toda la fracción que contuviese esteroides para valorar su cantidad relativa, se remarca la abundancia de este esteroide de 29 átomos de carbono (en consonancia con el predominio de estos compuestos, indicado por Matsuo & Sato 1991), con estereoquímica  $24\alpha$  (lo que aproximaría la sección en estudio a las plantas vasculares).

El ácido linoleico está considerado como parte integrante de los triglicéridos constituyentes de los glóbulos lipídicos (Karunen 1990). Esto podría explicar su abundancia y el hecho de haber sido hallado en forma de éster, aunque no se ha demostrado que sea el glicerol la molécula a la que se une. La cantidad en que aparece podría indicar predominio de los ácidos grasos de cadena corta (16-18 átomos de carbono), lo que se interpreta que es la línea seguida por las plantas vasculares (Karunen 1990). Sería interesante investigar la proporción entre estos ácidos y los de cadena más larga (20-22 átomos de carbono) para valorar este carácter, así como sus variaciones fenológicas, con el fin de averiguar si realmente esta relación es constante o no.

En cuanto a los triterpenos encontrados, tan sólo se ha conseguido una aproximación a su estructura. El tratarse de compuestos relacionados con la  $\alpha$ - o  $\beta$ -amirina tiene bastante relevancia, puesto que hasta la fecha ésta ha sido citada exclusivamente en esfagnos (Ives & O'Neill 1958). De confirmarse su, hasta la fecha, escasa frecuencia en musgos, la presencia de estos compuestos podría utilizarse taxonómicamente. Hay que subrayar, sin embargo, el escaso conocimiento que de estas sustancias se tiene en briófitos, tanto en relación al número de especies estudiadas como al conocimiento de su función. Herout (1990) advierte de la posible contaminación del espécimen briofítico con triterpenos originarios del sustrato, especialmente procedentes de plantas vasculares o de la actividad de microorganismos en el medio. Sin embargo, no es probable que los compuestos hallados respondan a una contaminación, dada su abundancia, y el hecho de encontrarse en muestras de muy alejada procedencia geográfica, algunas de ellas (las correspondientes a *Gr. incurva*), por encima del límite de la vegetación arbórea y no asociadas a otras plantas vasculares.

Por otro lado, el estudio debería completarse investigando la ubicación en la célula y el papel biológico de estas sustancias, en este grupo y en los briófitos en general.

En su conjunto, los resultados obtenidos en cuanto a lípidos (un éster de ácido graso, un esteroide y triterpenos) están en concordancia con los que ofrece la prueba histoquímica del azul de Nilo, que muestra preponderancia de lípidos neutros.

El no haberse encontrado flavonoides en ninguna de estas especies estudiadas es sorprendente, en tanto que en taxones relacionados se han detectado algunos de compleja estructura (biflavonoides), lo que sugeriría que la capacidad de síntesis (al menos de los monómeros) debiera de estar presente en toda la familia. Además, en una de las especies aquí estudiadas (*Gr. torquata*), McClure & Miller (1967) detectaron flavonoides (aunque sin dilucidar su estructura) aplicando, como en la presente investigación, vapores de amoníaco en las sustancias separadas por cromatografía en capa fina. De igual modo, en *Gr. orbicularis*, también incluida en esta tesis, se sugirió previamente (Estébanez 1991) la presencia de flavonoides por datos cromatográficos y procedentes del espectro de absorción de luz ultravioleta-visible. Esta discrepancia debe ser resuelta aplicando otros sistemas de extracción y análisis, para averiguar si es causada por el método seguido, o por una ausencia real de estas sustancias.

Un estudio que abarcara además los restantes fenoles podría ayudar a esclarecer su importancia en la pared celular, así como su posible valor taxonómico.





DISCUSIÓN GENERAL

Se presenta un cuadro-resumen de los resultados obtenidos en cuanto a los caracteres considerados de mayor importancia para la diferenciación de las especies. A través de su análisis, se manifiestan unas afinidades entre estos taxones, que se reseñan asimismo. La notación empleada no indica necesariamente mayor o menor grado de desarrollo, sino tan sólo, en principio, las semejanzas entre las especies.

CUADRO-RESUMEN

|                         | GAMETÓFITO                            |   |  |  |  |   |   |  | ESPORÓFITO                                |  |                             |   |   |   | ZONA DE TRANSICIÓN  |   |                         |  |  | ESPORAS  |               |                               |
|-------------------------|---------------------------------------|---|--|--|--|---|---|--|---|--|-----------------------------|---|---|---|---|---|-------------------------|--|--|--|---------------|-------------------------------|
|                         | Ápice de caulidio:<br>n° de hidroides | Ápice de caulidio:<br>distinción<br>entre epidermis y<br>parénquima | Afinidades según<br>la diferenciación<br>histológica<br>del caulidio | Constricción de<br>la pared en los<br>campos de<br>puncaduras<br>primarias | Afinidades según<br>los campos de<br>puncaduras<br>primarias | Filidio: células del<br>nervio (nivel<br>medio)     | Filidio: limbo<br>(mitad apical)                                | Afinidades según<br>la histología<br>del filidio | Seta (nivel<br>basal): n° de<br>hidroides | Seta (nivel<br>apical):<br>desarrollo de la<br>epidermis | Afinidades<br>según la seta | Ornamentación<br>del peristoma:<br>cara externa                         | Ornamentación del<br>peristoma: cara<br>interna             | Afinidades según<br>la ornamentación<br>del peristoma | Estratos de<br>células de<br>transferencia<br>gametofíticas | Estratos de<br>células de<br>transferencia<br>esporofíticas | Forma del<br>pie        | Contacto<br>con la traza<br>de hidroides | Afinidades según<br>la zona de<br>transición | Esporodermis   | Pinetas       | Afinidades según<br>la espina |
| <i>Gr. decipiens</i>    | 25-30                                 | clara   | A  | gradual  | B  | 4 céls.-guía,<br>esteroides                         | irregular-<br>mente biestrato,<br>células no<br>papilosas       | B  | 10-15                                     | 3 estratos   | A                           | Contornos celulares<br>poco resaltados.<br>Estrías y papilas            | Contornos celulares<br>poco resaltados. Papilas             | B   | 1-3   | 1-2   | ateznada                | no                                       | A  | Intina heteropolar, exina<br>y perina algo<br>heteropolares. Perina<br>discreta. | Reducidos     | C1                            |
| <i>Gr. elatior</i>      | fértiles: >50<br>estériles: -         | clara   | A<br>B   | muy brusca   | A  | 2 + 4-6 céls.-guía,<br>esteroides.                  | biestrato, células<br>muy papilosas                             | A  | 10-12                                     | 2-3 estratos   | A-B                         | Contornos celulares<br>muy resaltados.<br>Estrías                       | Contornos celulares<br>muy resaltados. Estrías<br>y papilas | A   | 1-3   | 1-2   | en lengüeta             | sí                                       | B1   | Intina heteropolar, exina<br>y perina algo<br>heteropolares. Perina<br>discreta. | Reducidos     | C1                            |
| <i>Gr. funalis</i>      | fértiles: >20<br>estériles: 8-15      | no clara  | D  | muy gradual  | C  | 2 céls.-guía,<br>esteroides, células<br>leptodermas | irregular-<br>mente biestrato,<br>células no<br>papilosas       | C2   | 10-12                                     | 2-3 estratos   | A-B                         | Contornos celulares<br>muy resaltados.<br>Estrías                       | Contornos celulares<br>medianamente<br>resaltados. Papilas  | A   | 1-3   | 1-2   | en lengüeta             | sí                                       | B1   | Prácticamente isopolar.<br>Exina y perina delgadas<br>y discretas                | Desarrollados | A                             |
| <i>Gr. harimani</i>     | -                                     | muy clara   | B  | gradual  | B  | 6 céls.-guía,<br>esteroides                         | sólo margen<br>biestrato, células<br>no papilosas               | B  | -   | -  | -                           | -   | -   | -   | -   | -   | -                       | -  | -  | -  | -             | -                             |
| <i>Gr. incurva</i>      | 6-10                                  | clara   | B  | gradual  | B  | 2 céls.-guía,<br>esteroides                         | irregular-<br>mente biestrato,<br>células no<br>papilosas       | C1   | -   | -  | -                           | -   | -   | -   | -   | -   | -                       | -  | -  | -  | -             | -                             |
| <i>Gr. orbicularis</i>  | >40                                   | no clara  | C  | gradual  | B  | 2 céls.-guía,<br>esteroides, células<br>leptodermas | sólo el extremo<br>apical biestrato,<br>células con<br>prórulas | C2   | >15                                       | 2 estratos   | B                           | Contornos celulares<br>medianamente<br>resaltados. Estrías y<br>papilas | Contornos celulares<br>poco resaltados. Papilas             | B   | 1-2   | 1-2   | en lengüeta             | sí                                       | B1   | Intina heteropolar, exina<br>y perina algo<br>heteropolares. Perina<br>continua  | Reducidos     | C2                            |
| <i>Gr. pulvinata</i>    | ca. 30                                | no clara  | C  | gradual  | B  | 2 céls.-guía,<br>esteroides, células<br>leptodermas | sólo margen<br>biestrato, células<br>no papilosas               | C2   | 12-15                                     | 3-4 estratos   | A                           | Contornos celulares<br>poco resaltados.<br>Papilas                      | Contornos celulares<br>poco resaltados. Papilas             | C   | 1-3   | 1-2   | en lengüeta<br>más roma | sí                                       | B2   | Intina heteropolar, exina<br>y perina algo<br>heteropolares. Perina<br>continua  | Muy reducidos | C2                            |
| <i>Gr. retracta</i>     | ca. 40                                | clara   | A  | -  | D  | 4-6 céls.-guía,<br>esteroides                       | banda marginal<br>biestrato, células<br>no papilosas            | B  | -   | -  | -                           | -   | -   | -   | -   | -   | -                       | -  | -  | -  | -             | -                             |
| <i>Gr. torquata</i>     | 6-10                                  | clara   | B  | muy gradual  | C  | 1-2 céls.-guía poco<br>diferenciadas,<br>esteroides | uniestrato,<br>células con<br>prórulas                          | C1   | -   | -  | -                           | -   | -   | -   | -   | -   | -                       | -  | -  | -  | -             | -                             |
| <i>Gr. trichophylla</i> | 20-25                                 | clara   | A  | gradual  | B  | 2 céls.-guía,<br>esteroides, células<br>leptodermas | biestrato, células<br>no papilosas                              | C2   | 8-10                                      | 2-3 estratos   | A-B                         | Contornos celulares<br>medianamente<br>resaltados. Papilas              | Contornos celulares<br>medianamente<br>resaltados. Papilas  | C   | 1-3   | 1-2   | cónica                  | sí                                       | A-B  | Intina, exina y perina<br>poco heteropolares.<br>Perina discreta                 | Desarrollados | B                             |

La variabilidad aquí encontrada se corresponde con la previamente descrita en cuanto a la morfología externa, en la que se basan, casi exclusivamente, las diversas subdivisiones de la sección realizadas por múltiples autores.

De ellas, se exponen las propuestas por Hagen (1909) y por Loeske (1930), por ser las más exhaustivas en cuanto a la utilización de caracteres, que integran clasificaciones anteriores y que sirven de base para la realización de nuevos agrupamientos posteriormente empleados (Jones 1933).

Hagen (1909):

- Subgénero *Gümbelia* (Hampe) Limpr. emend.

Sección *Funales* Hagen

*Gr. funalis*

- Subgénero *Rhabdogrimmia* Limpr.

Sección *Trichophyllae* Hagen

*Gr. trichophylla*

*Gr. incurva*

*Gr. pulvinata*

*Gr. decipiens*

*Gr. elatior*

*Gr. hartmanii*

Sección *Torquatae* Hagen

*Gr. torquata*

Loeske (1930):

Sección *Alpinae* J. Vilhem

*Gr. incurva*

Sección *Pulvinatae* Loeske

*Gr. orbicularis*

*Gr. pulvinata*

Sección *Torquatae* (Hagen) Loeske

*Gr. funalis*

*Gr. torquata*

Sección *Rhabdogrimmia* Limpr. emend. Loeske

*Gr. decipiens*

*Gr. elatior*

*Gr. hartmanii*

*Gr. trichophylla*

Con respecto a la diferenciación estructural del caulidio y del filidio, los agrupamientos aquí definidos, aunque remarcan la relación entre algunas especies pertenecientes a la misma subsección, no son consistentes entre sí ni con la subdivisión propuesta. Se destaca una cierta individualización de *Gr. funalis* (en concordancia con la subdivisión de Hagen 1909) y *Gr. elatior*.

En el grupo parece encontrarse, predominantemente, una relativamente escasa diferenciación del tejido epidérmico, que no presenta caracteres que permitan su tajante demarcación, aunque el conjunto de diferencias graduales con el parénquima puede permitir una distinción que llega a ser muy clara (*Gr. hartmanii*). La delimitación de este tejido se ve facilitada por las pruebas de detección de fenoles, lo que da importancia al estudio sobre

composición de la pared celular para las investigaciones histológicas.

Es preciso recordar las diferencias encontradas entre especímenes fértiles y estériles, y el hecho de haberse analizado poblaciones estériles de *Gr. torquata*, *Gr. retracta*, *Gr. incurva* y *Gr. hartmanii*, que podrían ofrecer distinta configuración estructural en estado fértil.

Además, existe variabilidad tanto entre taxones subespecíficos (Kawai 1965), como entre los resultados previamente registrados por otros autores y los aquí presentados. Por tanto, en conjunto, estos caracteres no parecen tener una constancia que les dé fiabilidad para estudios taxonómicos (con la posible excepción de la histología del nervio del filidio, aún insuficientemente estudiada).

Sin embargo, la gran plasticidad anatómica del gametófito de la sección *Trichophyllae* posee un alto interés biológico, si se considera como la capacidad de producir distintas especializaciones, y, por tanto, de diferentes respuestas de un patrón genéticamente determinado, aún mal definido por los estudios estructurales, a las exigencias marcadas por las condiciones ambientales.

Posiblemente, los caracteres que permiten la individualización de las especies se encuentren en el análisis de cada tejido, más que en la anatomía conjunta. Así, a pesar de la semejante ultraestructura básica de las paredes celulares, la morfología de las comunicaciones intercelulares del parénquima conductor marca una clara diferenciación de *Gr. retracta* y *Gr. elatior*, aunque este resultado debe considerarse con cautela al no haberse podido comparar diferentes poblaciones de estos taxones.

En cuanto a los estudios que contemplan la fase esporofítica o las esporas, cuya producción depende de ésta, la discusión está necesariamente restringida a las especies fértiles, lo que impide un análisis comparativo en toda la sección.

Aunque los tipos celulares, en líneas generales, concuerdan con los gametofíticos, frente al patrón anatómico relativamente abierto encontrado en el caulidio, la estructura del esporófito parece obedecer a una mayor predeterminación (tal vez por su origen embrionario). Esto se manifiesta en el ajuste de las especies a un modelo básico, con semejante desarrollo de tejidos (aparentemente con células más especializadas que el caulidio), que podría ser característico de sección o de género. Se señala, sin embargo, que la diferencia más notable, suficiente para el diagnóstico específico, la presentan, en cuanto al número de estratos epidérmicos, dos especies consideradas próximas (*Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*), y bastante correlacionadas con respecto a los caracteres aquí tratados.

Con respecto al perístoma, los datos reseñados no parecen muy consistentes, con la posible excepción del patrón de ornamentación (razón por la que se ha incluido en el cuadro), que es semejante al descrito por otros autores, aunque considerando que sus observaciones no incluyen microscopía de barrido. En cualquier caso, las afinidades que revela son absolutamente inconsistentes con los otros agrupamientos, salvo en la diferenciación de *Gr. funalis*.

La especialización de la zona de transición parece seguir, como en la fase esporofítica, unas líneas comunes en la sección. La principal variabilidad aparece en cuanto a la forma del pie, que quizá esté implicada en la relación entre la superficie de la placenta y el volumen del pie o del esporófito completo. Como en los demás casos, se requieren más estudios, pero la diferenciación no contradice las subsecciones establecidas.

La configuración en cuanto al número de estratos de células de transferencia es prácticamente constante en las especies estudiadas. Por tratarse de un modelo no descrito previamente, y dado que no llega a la veintena el número de especies en las que se ha investigado ultraestructuralmente la placenta, se apunta la necesidad de extender los estudios a otros taxones, con preferencia igualmente xerofíticos y perennes, para profundizar en si este patrón responde a una estrategia ambiental de plantas tolerantes al stress hídrico y al producido por las fuertes oscilaciones térmicas, o es característico del taxón.

El contacto del pie con la traza gametofítica a través de células semejantes a hidroides, es general en estas especies, exceptuando *Gr. decipiens*. En ésta se cumple, como en el resto, la degeneración de las células gametofíticas que rodean al pie, la diferencia estriba en que la traza no llega a las cercanías del pie, sino que se desvía hacia la ramificación que marca la cladocarpia. Dado el mayor desarrollo de la traza vascular en el gametófito que produce la presencia de una fructificación (como se aprecia comparando gametófitos fértiles y estériles), la peculiaridad de *Gr. decipiens* puede proceder de un menor de control, por parte del ápice fértil, sobre los tejidos subyacentes.

El análisis ultraestructural de la espora proporciona una alta variabilidad interespecífica que sugiere un agrupamiento divergente del que se deriva de otros datos, aunque se subraya de nuevo la individualización de *Gr. funalis*.

Los caracteres histoquímicos, por el contrario, no ofrecen gran diversidad en el conjunto estudiado. Parecen más útiles para detectar diferencias de composición en los tejidos o en los estratos de la pared celular de una misma especie. Aunque con valor sólo aproximado, en estas pruebas se destaca la abundancia de componentes no celulósicos (pectinas, fenoles), posiblemente responsables del enmascaramiento y retardo de la detección de la celulosa (salvo en los pelos filidiales), y la naturaleza ácida de la pared.

El análisis fitoquímico, al identificar tres lípidos como sustancias mayoritarias en las diez especies, se muestran en concordancia con las pruebas histoquímicas, que detectan una alta acumulación de este tipo de sustancias, que se perfilan como las preferentemente almacenadas. Además, la presencia de un triterpeno del tipo de la  $\alpha$ - o  $\beta$ -amirina, hasta ahora encontrado sólo en esfagnos, estimula una futura investigación que lo identifique por completo y dilucide su papel biológico y sistemático.

Por último, se remarca que los registros sobre invasión de los tejidos por parte de microorganismos, evidentemente condicionados por un factor externo al musgo, se han hecho sobre especies de distinta estructura anatómica, con muy diversas apetencias ecológicas, y de localidades de recolección muy alejadas. Dado el buen aspecto de los ejemplares afectados, parece tratarse de una asociación donde el musgo es capaz de proteger las regiones metabólicamente activas. Una cuestión de gran interés biológico sería analizar estos mecanismos de defensa, así como el papel de las relaciones entre el musgo y los microorganismos en el micro-ecosistema creado por aquél.

\* \* \* \* \*



En suma, se indica la ausencia de correlación entre los diversos caracteres estudiados. Los resultados obtenidos en esta investigación permiten, con las limitaciones que produce el escaso número de especímenes analizados, realizar las siguientes propuestas:

. Evaluar, como posibles marcadores de la sección o del género en cuestión, la configuración placentaria, las sustancias lipídicas presentes y la composición de las paredes celulares.

. Investigar, como posibles caracteres de diagnóstico específico, la ultraestructura de la espora, la ornamentación del perístoma, la forma del pie esporofítico, la abundancia y morfología de los campos de punteaduras primarias del caulidio, y la histología del nervio del filidio.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Una vez completado el estudio anatómico, palinológico y fitoquímico de las diez especies españolas de la sección *Trichophyllae* del género *Grimmia*, el análisis de los resultados permite extraer las siguientes conclusiones:

\* Se ha encontrado una alta variabilidad estructural en las fases haploides (caulidio, filidio y espora), que no se corresponde con la relativa homogeneidad de las fases diploides.

\* La seta y el caulidio presentan un esquema histológico básico similar, con epidermis, parénquima y traza de hidroides, sin que se observe la existencia de un leptoma. La conducción de nutrientes orgánicos se realiza, presumiblemente, por un parénquima conductor caulidial, con numerosos plasmodesmos dispuestos en campos de punteaduras primarias (salvo en *Gr. retracta*). El escaso número de comunicaciones intercelulares halladas en la seta debe ser reexaminado en especímenes muy jóvenes, donde las pruebas histoquímicas sugieren activa translocación.

\* En la seta se observan, como principales características diferenciales frente al caulidio, una polarización celular, una distinta subestratificación de la pared secundaria y una pérdida de actividad celular que progresa en sentido centrífugo.

\* La seta y el filidio muestran similitudes en cuanto a la disposición relativa de las células, a la composición de las paredes celulares y al engrosamiento periférico del estrato parietal primario.

\* Las trazas de hidroides son siempre claramente diferenciables por sus características ultraestructurales. Se pone de manifiesto la necesidad de la microscopía electrónica para estudiar la presencia y grado de desarrollo de este tejido, así como las características de los distintos tipos celulares.

\* Se indica, respecto a la anatomía de la seta, un carácter diagnóstico entre *Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*.

\* Se describe un modelo nuevo de configuración de los estratos de células de transferencia en la zona de transición (1-2 esporofíticas frente a 1-3 gametofíticas). Se apunta la inconsistencia de los caracteres que definen los patrones previamente propuestos.

\* Se describe por primera vez la estratificación, irregularmente sinuosa, de la exina en esporas maduras de musgos.

\* Se señala, para esta especie, la ausencia de correlación entre la variabilidad de los caracteres anatómicos y palinológicos estudiados.

\* Se ha identificado la presencia de  $\beta$ -sitosterol y ácido linoleico, y se ha aproximado la estructura de un triterpeno del tipo de la  $\alpha$ - o  $\beta$ -amirina, como sustancias comunes mayoritarias en estas especies. Se indica la inesperada ausencia de flavonoides.

\* Se describe, por primera vez para musgos xerofíticos y para esporófitos de musgos, la presencia de microorganismos, eucariotas y procariotas, en el interior de las células de estas especies.

## CONCLUSIONES

---

\* Se refiere la existencia de cristales en las células centrales de caulidio de *Gr. orbicularis*, y en las de pie y seta de *Gr. pulvinata*, lo que plantea la cuestión acerca de su origen, por transporte o por biomineralización.

\* Se subraya la necesidad de incluir datos sobre la ultraestructura, histoquímica y fitoquímica en las descripciones integradas de los distintos taxones de briófitos.

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

ABELLA, L. 1994. **Contribución al estudio de los estomas en musgos: diez especies de Pottiaceae (Bryopsida, Bryophyta)**. Memoria de Licenciatura, inédita. Universidad Complutense de Madrid.

AL-HASAN, R.H., W.E. EL-SAADAWI, A.M. ALI & S.S. RADWAN. 1990. Lipids of the gametophyte and sporophyte of *Funaria hygrometrica*. Comparison with lipids from leaves of vascular plants. **Bryologist** 93 (1): 44-49.

ALLORGE, P. 1928. Notes sur la flore bryologique de la Péninsule Ibérique. I. Muscinées récoltées par M. Roger Heim dans la Chaîne Cantabrique. **Rev. Bryol., n. s.**, 1: 52-58.

ALLORGE, P. 1947. **Essai de Bryogéographie de la Péninsule Ibérique**. In: Lechevalier, P. (ed.) **Enciclopédie biogéographique et écologique**. I. París.

ALPERT, P. 1989. Translocation in the nonpolytrichaceous moss *Grimmia laevigata*. **Amer. J. Bot.** 76(10):1524-1529.

ANDERSON, L.E. 1954. Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryophytes. **Bryologist** 57: 242-247.

ANDERSON, W.H., J.M. HAWKINS, J.L. GELLERMAN & H. SCHLENK. 1974. Fatty acid composition as criterion in taxonomy of mosses. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 38: 99-103.

ASAKAWA, Y. 1986. Chemical relationships between algae, bryophytes and pteridophytes. **J. Bryol.** 14: 59-70.

ASAKAWA, Y. 1988a. In: Rahman, A.-U. (ed.) **Studies in natural products chemistry**, p. 277. Amsterdam.

ASAKAWA, Y. 1988b. In: Chopra, R.N. & S.C. Bhatla (eds.) **Physiology and biochemistry of development of bryophytes**. Florida.

ASAKAWA, Y. 1990. Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In: Zinsmeister, H.D. & R. Mues (eds.) **Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy**, pp. 369-410. Oxford.

AZFELIUS, B.M. 1957. On new methods in physical cell research and their application in studies of pollen grain and spores. In: Erdtman, G. (ed.) **Pollen and spore morphology. Plant taxonomy**, pp. 125-134. Nueva York.

BAILEY, D.S. & D.H. NORTHCOTE. 1976. **Biochem. J.** 156: 295-301.



- BALSAMO, J. & J. DE NOTARIS. 1838. Pugillus muscorum Italiae novorum vel minus cognitorum. **Mem. R. Acad. Sci. Torino** 40: 327-351.
- BASSI, M. & M. A. FAVALI. 1973. Seta ultrastructure in *Mnium orthorhynchum*. **Nova Hedwigia** 24: 337-346.
- BENDZ, G., O. MARTENSSON & E. NILSSON. 1966. Moss pigments IV. An investigation of the occurrence of proanthocyanidins in mosses. **Acta Chem. Scand.** 20: 277-278.
- BERTHIER, J. 1972. Recherches sur la structure et le développement de l'apex du gamétophyte feuillée des mousses. **Rev. Bryol. Lichénol.** 38: 421-551.
- BERTHIER, J., E.-J. BONNOT, M.-C. FABRE & C. HÉBANT. 1974. L'apparat sécréteur des Bryales: données morphologiques, ultrastructurales et cytochimiques. **Bull. Soc. Bot. Fr.** 121, Suppl. Coll. Bryol: 97-100.
- BEWLEY, J.D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 30:195-238.
- BLAIKLEY, N.M. 1933. The structure of the foot in certain mosses and in *Anthoceros laevis*. **Trans. Roy. Soc. Edinburgh** 57: 669-709.
- BLAND, E., A. LOGAN, M. MENSUN & S. STERNHELL. 1968. **Phytochem.** 7: 137.
- BOPP, M. & H.-P. WENIGER. 1971. Wassertransport vom Gametophyten zum Sporophyten bei Laubmoosen. **Z. Pflanzenphysiol.** 64: 190-198.
- BOROS, Á. & M. JÁRAI-KOMLÓDI. 1975. **An atlas of recent European moss spores.** Budapest.
- BOUDIER, P. 1989. Observations sur la structure de la paroi et de l'aperture de la tétraspore de *Sphagnum fimbriatum* Wilson. **Cryptogamie, Bryol. Lichénol.** 10 (4): 301-308.
- BOWER, F.O. 1908. **The origin of a land flora. A theory based upon facts of alternation.** Londres.
- BROWN, R.C. & B.E. LEMMON. 1984. Ultrastructure of sporogenesis in the moss *Amblystegium riparium*. II. Spore wall development. **J. Hattori Bot. Lab.** 57: 139-152.
- BROWN, R.C. & B.E. LEMMON. 1985. Phylogenetic aspects of sporogenesis in *Archidium*. **Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.** 11: 25-39.

BROWN, R.C., B.E. LEMMON & Z.B. CAROTHERS. 1982a. Spore wall development in *Sphagnum lescurii* Sull. **Can. J. Bot.** 60: 2394-2409.

BROWN, R.C., B.E. LEMMON & Z.B. CAROTHERS. 1982b. Spore wall ultrastructure of *Sphagnum lescurii* Sull. **Rev. Palaeobot. Palynol.** 38: 99-107.

BROWNING, A.J. & B.E.S. GUNNING. 1977. An ultrastructural and cytochemical study of the wall membrane apparatus of transfer cells using freeze-substitution. **Protoplasma** 93: 7-26.

BROWNING, A.J. & B.E.S. GUNNING. 1979a. Structure and function of transfer cells in the sporophyte haustorium of *Funaria hygrometrica* Hedw. I. The development ultrastructure of haustorium. **Journ. Exp. Bot.** 30: 1233-1246.

BROWNING, A.J. & B.E.S. GUNNING. 1979b. Structure and function of transfer cells in the sporophyte haustorium of *Funaria hygrometrica* Hedw. II. Kinetics of uptake of labelled sugars and localization of absorbed products by freeze-substitution and autoradiography. **Journ. Exp. Bot.** 30: 1265-1273.

BROWNING, A.J. & B.E.S. GUNNING. 1979c. Structure and function of transfer cells in the sporophyte haustorium of *Funaria hygrometrica* Hedw. III. Translocation of assimilate into the attached sporophyte and along the seta of attach sporophytes isolated from *Polytrichum formosum* and ultrastructural characteristics of the haustorium transfer-cells. **Ann. Bot.** 51:167-173.

BRUCH, P., W. P. SCHIMPER & W.T. GÜMBEL. 1845. **Bryologia europaea seu genera muscorum Europaeorum monographice illustrata**. Stuttgart.

BRUGGEMAN-NANNENGA, M.A. & W. BERENDSEN. 1990. On the peristome types found in the Fissidentaceae and their importance for the classification. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 68: 193-234.

BRUGGEMAN-NANNENGA, M.A. & C.M. ROOS. 1990. Cladistic relationships between the main peristome types of the Fissidentaceae. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 68: 235-238.

BUDZIKIEWICZ, H., J.M. WILSON & C. DJERASSI. 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. **J. Am. Chem. Soc.** 85: 3668-3699.

CAMPBELL, D.H. 1918. **The structure and development of mosses and ferns**. Nueva York.

CAO, T. & D.H. VITT. 1986. A taxonomic revision and phylogenetic analysis of *Grimmia* and *Schistidium* (Bryopsida; Grimmiaceae) in China. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 61: 123-247.

- CAPUTO, G. & R. CASTALDO. 1968. Prime osservazione sul "sistema conduttore" di *Mnium undulatum* Weiss. **Delpinoa**, n.s. 8-9: 85-90.
- CARRIÓN, J.S., J. GUERRA & R.M. ROS . 1990. Spore morphology of the European species of *Phascum* Hedw. (Pottiaceae, Musci). **Nova Hedwigia** 51: 411-433.
- CARRIÓN, J.S., R.M. ROS & J. GUERRA. 1993. Spore morphology in *Pottia starkeana* (Hedw.) C. Müll. (Pottiaceae, Musci) and its closest species. **Nova Hedwigia** 56 (1-2): 89-112.
- CASAS, C. 1991. New checklist of Spanish mosses. **Orsis** 6: 3-26
- CASTALDO, R., S. GIORDANO & R. LIGRONE. 1981. Scanning electron microscope characterization of spores of European Buxbaumiaceae. **J. Bryol.** 11: 743-746.
- CATALANO, S., A. MARSILI, I. MORELLI & M. PACCHIANI. 1976. Triterpenoids and fatty acids from mosses. Obtusifoliol from *Racomitrium lanuginosum*. **Phytochemistry** 15: 1178-9.
- CAVERS, F. 1911. The inter-relationships of the Bryophyta. **New Phytologist** 4.
- CLARKE, G.C.S. 1979. Spore morphology and bryophyte systematics. In: Clarke, G.C.S. & J.C. Duckett. (eds.) **Bryophyte systematics**, pp. 231-250. Londres.
- CORLEY, M.F.V., A.C. CRUDWELL, R. DÜLL, M.O. HILL & A.J.E. SMITH. 1981. Mosses of Europe and the Azores; an annotated list of species, with synonyms from the recent literature. **J. Bryol.** 11: 609-689.
- CORTELLA, A., E. RON, B. ESTEBANEZ & C. ALFAYATE. 1994. On the occurrence of primary pit field cells in the caulidia of *Hookeria lucens* (Hedw.) Sm. (Bryopsida, Bryophyta). **J. Hattori Bot. Lab.** 77: 287-294.
- CROSBY, M.R., R.E. MAGILL & C.R. BAUER. 1992. **Index of mosses**. Miss. Bot. Garden. Missouri.
- CRUM, H.A. & L.E. ANDERSON. 1981. **Mosses of eastern North America**. Vol. 1. Nueva York.
- CHAUHAN, E. & M. LAL. 1980. Histochemical and ultrastructural investigations on the foot of the moss *Physcomitrium cyathicarpum* Mitt. **Ann. Bot.** 50: 763-769.
- DEGUCHI, H. 1978. A revision of the genera *Grimmia*, *Schistidium* and *Coscinodon* (Musci) of Japan. **J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 2**, 16: 121-256.

DENIZOT, J. 1976. Remarques sur l'édification des différentes couches de la paroi sporale à exine lamellaire de quelques Marchantiales et Sphaerocarpales. In: Ferguson, I.K. & J. Muller (eds.) **The evolutionary significance of the exine**, pp. 185-210. Londres.

DOWNEY, J.A. & D.V. BASILE. 1989. New evidence for lignin in bryophytes: UV, IR and proton analysis of a thioglycolic acid extraction from sporophytes of *Pellia epiphylla*. **Amer. J. Bot.** 76 (suppl. 6): 191.

DUCKETT, J.F. 1986. Ultrastructure in bryophyte systematics and evolution: an evaluation. **J. Bryol.** 14: 25-42.

DUCKETT, J.F. & K.S. RENZAGLIA. 1988. Cell and molecular biology of bryophytes: implications for taxonomy and phylogeny. **Bot. J. Linn. Soc.** 35: 154-167.

DUCKETT, J.G., K.S. RENZAGLIA & E.A. SMITH. 1988. Preparative techniques for transmission electron microscopy of bryophytes. In: Glime, J.M. (ed.) **Methods in Bryology**, pp. 181-192, Nichinan.

EDWARDS, S.R. 1979. Taxonomic implications of cell patterns in haplolepidous moss peristomes. In: Clarke, G.C.S. & J.G. Duckett (eds.) **Bryophyte systematics**, pp. 317-346. Londres.

EDWARDS, S.R. 1984. Homologies and inter-relationships of moss peristomes. In: Schuster, R.M. (ed.) **New manual of Bryology**, pp. 658-695. Nichinan.

ERDTMAN, G. 1969. **Handbook of palynology**. Munksgaard.

ERICKSON, M. & G.E. MIKSCH. 1974. On the occurrence of lignin or polyphenols in some mosses and liverworts. **Phytochemistry** 13: 2295-2299.

ESTÉBANEZ, B. 1991. **Apuntes para la biología de *Grimmia orbicularis* Bruch ex Wils. (Grimmiaceae, Grimmiales, Bryopsida, Bryophyta)**. Memoria de Licenciatura, inédita. Universidad Complutense de Madrid.

EYMÉ, J. & C. SUIRE. 1967. Au sujet de l'infrastructure des cellules de la région placentaire de *Mnium cuspidatum* Hedw. (Mousse bryale acrocarpe). **C.R. Séanc. Acad. Sci. Paris Série D**, 265: 1788-1791.

FAEGRI, K. & J. IVERSEN. 1989. **Textbook of pollen analysis**. 4<sup>a</sup> ed. Londres.

FAVALI, M. A. & F. GIANNI. 1973. Sporophyte ultrastructure in *Tortula muralis* Hedw. **Österr. Bot. Z.** 122: 323-331.

FAVALI, M. A. & F. GIANNI. 1975. Seta ultrastructure in *Pogonatum aloides* Hedw. **Giorn. Bot. Ital.** 109: 375-385.

- FELIX, H. 1988. Fungi on bryophytes, a review. **Bot. Helvetica** 98(2):239-269.
- FINOCCHIO, A.F. 1967. Pitting of cells in moss gametophores. **Bull. Torrey Bot. Club** 94 (1): 18-20.
- FONT QUER, P. 1985. **Diccionario de Botánica**. 1ª ed., 9ª reimpr. Barcelona.
- GAHAN, P.B. 1984. **Plant histochemistry and cytochemistry. An introduction**. Orlando.
- GAMBARDELLA, R., F. ALFANO, M. GARGIULO & C. SQUILLACIOTI. 1994. Studies on the sporogenous lineage in the moss *Timmiella barbuloidea*. IX. Development of the tapetum. **Ann. Bot.** 73: 369-375.
- GAMBARDELLA, R., R. LIGRONE & R. CASTALDO. 1981. Ultrastructure of the sporophyte foot in *Phaeoceros*. **Cryptog., Bryol. Lichénol.** 2:23-45.
- GAMBARDELLA, R. & M. DE LUCIA SPOSITO. 1981-1982. Ultrastructure of the placental region in a liverwort: *Mannia androgyna*. **Delpinoa** 23-24 :177-184.
- GAMBARDELLA, R. & M. DE LUCIA SPOSITO. 1983. Placenta ultrastructure in *Plagiochasma rupestre* (Forst.) Steph. (Marchantiales, Hepaticae). **Giorn. Bot. Italiano** 117: 166-167.
- GEIGER, H., S. ANHUT & H.D. ZINSMEISTER. 1988. Biflavones from some mosses. **Z. Naturforsch.** 43c: 1-4.
- GOEBEL, K. V. 1930. **Organographie der Pflanzen II**. Jena.
- GOEBEL, K. 1969. **Organography of plants. Part II. Special organography**. Londres.
- GRAHAM, L.E. & C.F. DELVICHE. 1991. Phylogenetic connections between the 'green algae' and the 'bryophytes'. In: Miller, N. (ed.) **Advances in Bryology** 4, pp. 213-244. Berlin.
- GRAHAM, L.E. & L. W. WILCOX. 1983. The occurrence and phylogenetic significance of putative placental transfer cells in the green alga *Coleochaete*. **Amer. J. Bot.** 70:113-120.
- GREVILLE, R.K. 1824. **Flora Edinensis**. Edimburgo.
- GREVILLE, R.K. 1826. **Scottish cryptogamic flora**. Edimburgo.
- GRIFFIN, D., III. 1981. Spore ornamentation in *Leiomela* (Musci: Bartramiaceae). **Cryptog., Bryol. Lichénol.** 2 (1): 101-106.

GRIFFIN, D., III. 1982. Spore morphology and generic concepts in the Bartramiaceae. **Beih. Nova Hedwigia** 71: 269-270.

GRIFFIN, D., III & M.L. ACUÑA. 1983. Spore ornamentation studies in *Anacolia* (Musci: Bartramiaceae). **Cryptog., Bryol. Lichénol.** 4 (2): 155-160.

GUNNING, B.E.S., J.S. PATE, & L.G. BRIARTY. 1968. Specialized "transfer cells" in minor veins of leaves and their possible significance in phloem translocation. **Journ. Cell Biol.** 37: 7-12.

GUNNING, B.E.S., J.S. PATE, & L.G. BRIARTY. 1969. Transfer-cells. Plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes. Their occurrence, structure and development. **Protoplasma** 68: 107-133.

GUNNING, B.E.S., J.S. PATE, & L.G. BRIARTY. 1974. Transfer-cells. In: Robards, A.W. (ed.) **Dynamic aspects of plant ultrastructure**, pp. 441-481. Londres.

HABERLANDT, G. 1914. **Physiological plant anatomy**. Londres.

HABERLANDT, G. 1886. Beiträge zur Anatomie und Physiologie der Laubmoose. **Jahrbuch Wiss. Bot.** 17: 359-498.

HAGEN, I. 1909. Forarbejder til en Norsk Lövmosflora. **K. Norsk Vid. Selsk. Skrift.** 5: 3-94.

HARTMAN, C.J. 1861. **Handbok i Skandinaviens flora**. 8ª ed. Estocolmo.

HARWOOD, J.L. 1980. Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. In: Stumpf, P.K. (ed.) **The biochemistry of plants. Vol. 4. Lipids: structure and function**, pp. 2-56. Nueva York.

HÉBANT, C. 1964. Sur les leptoïdes des bryophytes. **C.R. Acad. Sci (Paris)** 262D: 2585-2588.

HÉBANT, C. 1965. Signification et évolution des tissus conducteurs chez les Bryophytes. **Nat. Monsp. Sér. Bot.** 16: 79-86.

HEBANT, C. 1970. Etude histochemique, histoenzymologique et intrastructurale de la différenciation des tissus conducteurs dans le tige aérienne feuillée de quelques Mousses Polytrichales. **C.R. Acad. Sci. (Paris)** 271D: 1361-1364.

HÉBANT, C. 1974. Studies on the development of the conducting tissue-system in the gametophytes of some Polytrichales. II. Development and structure at maturity of the hydroids of the central strand. **J. Hattori Bot. Lab.** 38: 565-607.

- HÉBANT, C. 1975. Organization of the conducting tissue-system in the sporophytes of *Dawsonia* and *Dendroligotrichum* (Polytrichales, Musci). **Journ. Hattori Bot. Lab.** 39: 235-254.
- HÉBANT, C. 1977. **The conducting tissues of bryophytes**. Vaduz.
- HÉBANT, C. 1979. Conducting tissues in bryophyte systematics. In: Clarke, G.C.S. & J.G. Duckett (eds.) **Bryophyte systematics**, pp. 365-383. Londres.
- HECKMAN, C.A. 1970. Spore wall structure in the Jungermanniales. **Grana** 10: 109-119.
- HEDWIG, J. 1801. **Species muscorum frondosorum**. Leipzig.
- HEROUT, V. 1990. Diterpenes and higher terpenes from bryophytes. In: Zinsmeister, H.D. & R. Mues (eds.) **Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy**, pp. 83-102. Oxford.
- HERRMANN, R. 1990. Biomonitoring of organic and inorganic trace pollutants by means of mosses. In: Zinsmeister, H.D. & R. Mues (eds.) **Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy**, pp. 319-335. Oxford.
- HIROHAMA, T. 1978. Spore morphology of bryophytes observed by scanning electron microscope, IV. Grimmiaceae. **Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B (Bot.)** 4 (1): 33-42.
- HORTON, D.G. 1982. The evolutionary significance of superficial spore characters in the Bryidae. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 53: 99-105.
- HUNECK, S. 1983. Chemistry and biochemistry of bryophytes. In: Schuster, R.M. (ed.) **New manual of Bryology I**, pp. 3-116. Nichinan.
- HUNECK, S., K. SCHREIBER & S. JÄNICKE. 1973. Inhaltsstoffe einiger Laubmoose. **Phytochemistry** 12: 2533-2534.
- HUSNOT, T. 1884-1890. **Muscologia gallica. I. Acrocarpes**. París.
- IVES, D.A.J. & A.N. O'NEILL. 1958. The chemistry of peat. **Canad. J. Chem.** 36: 926-930.
- JACOBS, M. & P.H. RUBERY. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. **Science** 241: 346-349.
- JARVIS, L.R. 1974. Electron microscope observations of spore wall development in *Funaria hygrometrica*. **Proceedings 8<sup>th</sup> Congress on Electron Microscopy**, Canberra, 2: 620-621.



JENSEN, W.A. 1962. **Botanical histochemistry. Principles and practice.** San Francisco.

JENSEN, K.G. & R.L. HULBARY. 1978. Chloroplast development during sporogenesis in six species of mosses. **Amer. J. Bot.** 65: 822-883.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique.** Nueva York.

JONES, G.N. 1933. Grimmiaceae. In: Grout, A.J. 1933. **Moss flora of North America, North Mexico. Part 1. II.** Newfane, Vermont.

KARUNEN, P. 1990. The acyl lipids of bryophytes. In: Zinsmeister, H.D. & R. Mues (eds.) **Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy**, pp. 121-143. Oxford.

KARUNEN, P. 1982. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 53: 255-261.

KARUNEN, P., H. MIKOLA, R. LINKO & E.K. EURANTO. 1979. Lipids in *Sphagnum* mosses of various ages. **Can. J. Bot.** 57: 1335-1339.

KAWAI, I. 1965. Studies on the genus *Grimmia* with reference to the affinity of gametophyte. **Sci. Rep. Kanazawa Univ.** 10: 79-132.

KAWAI, I. 1969. Studies on the affinity regarding the conducting tissue of the sporophyte in the Musci. (2). On the seta in some species of the family Polytrichaceae. **Sci. Rep. Kanazawa Univ.** 14: 39-57.

KAWAI, I. & K. IKEDA. 1970. Systematic studies on the conducting tissues of the gametophyte in Musci (I). On the affinity regarding the conducting tissue of the stem in some species of Polytrichaceae. **Sci. Rep. Kanazawa Univ.** 5(2): 71-98.

KAWAI, I. 1989. Systematic studies on the conducting tissues of the gametophyte in Musci. (XVI). Relationships between the anatomical characteristics of the stem and the classification system. **Asian Jour. Pl. Sci.** 1(2): 19-52.

KEEVER, C. 1957. Establishment of *Grimmia laevigata* on bare granite. **Ecology**, 38: 422-429.

KELLEY, C. 1969. Wall projections in the sporophyte-gametophyte junction of *Sphaerocarpos*. **Journ. Cell Biol.** 41: 910-914.

KINDBERG, N.C. 1897. **Species of European and North-American Bryineae (mosses). Part 2. Acrocarpous.** Linkoepig.

KOHN, G., S. DEMMERLE, O. VANDERKERKHOVE, P. BEUTELMANN & E. HARTMANN. 1987. Distribution and chemotaxonomic significance of acetylenic fatty acids in mosses of the Dicranales. **Phytochemistry** 26: 2271-2275.

LAL, M. & E. CHAUHAN. 1981. Transfer cells in the sporophyte-gametophyte junction of *Physcomitrium cyathicarpum* Mitt. **Protoplasma** 107 : 79-83.

LAL, M. & E. CHAUHAN. 1982. Cytochemical studies on sporogenesis in *Physcomitrium cyathicarpum* Mitt. Nature of the spore mother cell wall. **Cryptog. Bryol. Lichénol.** 3(1): 51-57.

LAL, M. & A. NARANG. 1985. Ultrastructural and histochemical studies of transfer cells in the callus and apogamous sporophytes of *Physcomitrium coorgense* Broth. **New Phytologist** 100: 225-231.

LAMPARTER, T., P. LUTTERBÜSE, H.A.W. SCHNEIDER-POETSCH & R. HERTEL. 1992. **Photochem. Photobiol.** 56: 697-707.

LARA, F. & V. MAZIMPAKA. 1993. *Orthotrichum ibericum* sp. nov., a new moss from the Iberian Peninsula. **Nova Hedwigia** 56 (1-2): 263-271.

LEITGEB, H. 1884. **Bau und Entwicklung der Sporenhäute und deren Verhalten bei der Keimung.** Graz.

LEWINSKY, J. 1989. *Zygodon* Hook. & Tayl. in Australasia: a taxonomic revision including SEM-studies of peristomes. **Lindbergia** 15: 109-139.

LIGRONE, R. 1986. Structure, development and cytochemistry of mucilage-secreting hairs in the moss *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Moenk. **Ann. Botany** 58: 859-868.

LIGRONE, R. & R. GAMBARDELLA. 1988a. The ultrastructure of the sporophyte-gametophyte junction and its relationships to bryophyte evolution. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 64: 187-196.

LIGRONE, R. & R. GAMBARDELLA. 1988b. The sporophyte-gametophyte junction in bryophytes. In: Miller (ed.). **Advances in Bryology**, 3, pp. 227-274. Berlín.

LIGRONE, R., R. GAMBARDELLA & R. CASTALDO. 1980. Studies on *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Moenk. I. Histological and ultrastructural differentiation of the cauloid. **Cryptog., Bryol., Lichénol.** 1: 115-142.

LIGRONE, R., R. GAMBARDELLA. & M.L. DE LUCIA SPOSITO. 1982a. Ultrastructure of the sporophyte foot-gametophyte vaginula complex in *Timmiella barbuloidea* (Brid.) Moenk. **Planta** 154: 414-425.

LIGRONE, R., R. GAMBARDELLA. & M.L. DE LUCIA SPOSITO. 1982b. Gametophyte and sporophyte ultrastructure in *Buxbaumia piperi* Best (Buxbaumiales, Musci). **Journ. Hattori Bot. Lab.** 52: 465-499.

LIGRONE, R. & K.S. RENZAGLIA. 1990. The sporophyte-gametophyte junction in the hornwort, *Dendroceros tubercularis* Hatt. (Anthocerotophyta). **New Phyto.** 114: 497-505.

LIMPRICHT, K.G. 1885-1889. **Die Laubmoose Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. I.** Leipzig.

LOESKE, L. 1930. Monographie der europäischen Grimmiaceen. **Bibliotheca Botanica**, 101. Stuttgart.

LOHMANN, C.E.J. 1903. **Beitrag zur Chemie und Biologie der Lebermoose.** Disertación inaugural de la Universidad de Jena, pp. 1-42.

LÓPEZ SÁEZ, J.A. 1994. **Flavonoides en Bartramiaceae Schwaegr. (Musci, Bryophyta): aspectos quimiosistemáticos y actividad biológica.** Tesis Doctoral, inédita. Universidad Complutense de Madrid.

LORCH, W. 1925a. Über die Saugzellen im Fusse und in der Vaginula bei den Laubmoosen. **Ber. deuts. bot. Ges.** 43: 120-127.

LORCH, W. 1925b. Über die Haustorial schläuche am Fusse der Laubmoose. **Ber. deuts. bot. Ges.** 43: 262-270.

LORCH, W. 1931. Anatomie der Laubmoose. In: Linsbauer, K. (ed.) **Handbuch der Pflanzenanatomie Bd. VIII.** Berlin.

LORCH, W. 1894. Beiträge zur Anatomie und Biologie der Laubmoose. **Flora** 78:428-452.

LORENTZ, G.P. 1867. Studien zur vergleichenden Anatomie der Laubmoose. **Flora** 50: 241-248, 257-264, 289-297, 305-313, 526-528, 529-540, 544-558.

LLORET, F. 1989. Briófitos del Alto Valle del Ter. **Orsis** 4: 11-46.

MAGILL, R.E. (ed.). 1990. **Glossarium polyglottum Bryologiae.** St. Louis.

MAIER, K. 1967. Wandlabyrinth im Sporophyten von *Polytrichum*. **Planta** 77: 108-126.

MAIER, K. & U. MAIER. 1972. Localization of b-glycerophosphatase and Mg<sup>++</sup> activate adenosine triphosphatase in a moss haustorium, and the relation of these enzymes to the cell wall labyrinth. **Protoplasma** 75: 91-112.

MANN, S. 1988. Molecular recognition in biomineralization. **Nature** (Londres) 332: 119-124.

- MARKHAM, K.R. & L.J. PORTER. 1969. Flavonoids in the green algae (Chlorophyta). **Phytochemistry** 8: 1777-1781.
- MARKHAM, K.R., L.J. PORTER, R. MUES, H.D. ZINSMEISTER & R. BREHM. 1976. Flavonoid variation in the liverwort *Conocephalum conicum*: evidence for geographical races. **Phytochemistry** 15: 147-150.
- MATEU, I. & F. PUCHE. 1984. Esporas de briófitos. I. **An. Biol.**, 2 (Secc. Esp. 2): 335-345.
- MATSUO, A. & A. SATO. 1991. Sterols of mosses. **Phytochemistry** 30 (7): 2305-2306.
- MAUSETH, J.D. 1988. **Plant Anatomy**. California.
- McCLURE, J.W. & H.A. MILLER. 1967. Moss chemotaxonomy. A survey for flavonoids and their taxonomic implications. **Nova Hedwigia** 14: 111-125.
- McCLYMONT, J.W. 1954. **Spores of the Musci: their structure and significance in systematic research**. Tesis Doctoral. Universidad de Michigan. Ann Arbor.
- McCLYMONT, J.W. 1955. Spore studies in the Musci with special reference to genus *Bruchia*. **Bryologist** 58: 287-306.
- McCLYMONT, J.W. & D.A. LARSON. 1964. An electron-microscopic study of spore wall structure in the Musci. **Amer. J. Bot.** 51(2): 195-200.
- MIKSCHE, G.E. & S. YASUDA. 1978. **Phytochem.** 17: 503.
- MOGENSEN, G.S. 1978. Spore development and germination in *Cinclidium* (Mniaceae, Bryophyta), with special reference to spore mortality and false anisospory. **Can. J. Bot.** 56: 1032-1060.
- MOGENSEN, G.S. 1981. The biological significance of morphological characters in bryophytes: the spore. **Bryologist** 84 (2): 187-207.
- MOGENSEN, G.S. 1983. The spore. In: Schuster, R.M. (ed.) **New manual of Bryology**, pp. 325-342. Nichinan.
- MUELLER, D.M.J. 1974. Spore wall formation and chloroplast development during sporogenesis in the moss *Fissidens limbatus*. **Amer. J. Bot.** 61: 525-534.
- MUELLER, D.M.J. & A.J. NEUMANN. 1988. Peristome structure and the regulation of spore release in arthrodontous mosses. In: Miller, N.G. (ed.) **Advances in Bryology** 3, pp. 135-158. Stuttgart.

NEIDHART, H.V. 1979. Comparative studies of sporogenesis in bryophytes. In: Clarke, G.C.S. & J.G. Duckett (eds.) **Bryophyte systematics**, pp. 251-280. Londres.

NYHOLM, E. 1956. **Moss flora of Fennoscandia. II. Musci**. Fasc. 2. Lund.

OLESEN, P. & G.S. MOGENSEN. 1978. Ultrastructure, histochemistry and notes on germination stages of spores in selected mosses. **Bryologist** 81 (4): 493-516.

OLIVER, M.J. & J.D. BEWLEY. 1984. Desiccation and ultrastructure in bryophytes. In: Schultze-Motel, W. (ed.) **Advances in Bryology** 2, pp. 91-111. Vaduz.

PACINI, E. & G.G. FRANCHI. 1991. Diversification and evolution of the tapetum. In: Blackmore, S. & S.H. Barnes (eds.) **Pollen and spores. Patterns of diversification**. The Systemetic Association. Special Volumen 44, pp. 301-316. Oxford.

PAOLILLO, D.J. 1964. The plastids of *Polytrichum commune*. I. The capsule at meiosis. **Protoplasma** 58: 667-680.

PAOLILLO, D.J. 1969. The plastids of *Polytrichum* II. The sporogenous cells. **Cytologia** 34: 133-144.

PATE, J.S., B.E.S. GUNNING & L.G. BRIARTY. 1969. Ultrastructure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. **Planta** 85: 11-34.

PATON, J.A. & J.V. PEARCE. 1957. The occurrence, structure and function of the stomata in british Bryophytes. Part I: Occurrence and structure. J.A. Paton. Part II: Functions and physiology, J.A. Paton & J.V. Pearce. **Trans. British Bryological Ser.** 3: 228-259.

PATTERSON, G.W., G.R. WOLFE, T.A. SALT & P.-L. CHIU. 1990. Sterols of bryophytes with emphasis on the configuration at C-24. In: Zinsmeister, H.D. & R. Mues (eds.) **Bryophytes. Their chemistry and chemical taxonomy**, pp. 103-108. Oxford.

PEARSE, A.G.E. 1961. **Histochemistry. Theoretical and applied**. 2<sup>a</sup> ed. Londres.

PERSSON, H. 1956. Studies in copper mosses. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 17: 1-18.

PHILIBERT, H. 1884-1902. De l'importance du péristome sur les affinités naturelles des mousses. **Rev. Bryol.** 11: 49-52, 65-72 (1884). Études sur le péristome. **Ibid.** 11: 81-87 (1884); 12: 67-77, 81-85 (1885); 13: 17-27 (1886); 14: 9-11, 81-90 (1887); 15: 6-12, 24-28, 37-44, 50-60, 65-69, 90-93 (1888); 16: 1-9, 39-44, 67-77 (1889); 17: 8-12, 25-29, 39-42 (1890); 23: 36-38, 41-56 (1896); 28: 56-59, 127-130 (1901); 10-13 (1902).

POTONIE, H. 1883. Über die Zusammensetzung der Leitbündel bei den Gefässkryptogamen. **Ib. König. Bot. Gart.** 2: 233-278.

- PRESTON, R.D. 1982. The case for multinet growth in growing walls of plant cells. **Planta** 155: 356-363.
- REITSMA, T. 1969. Size modification of recent pollen grains under different treatments. **Rev. Palaeobot. Palynol.** 9: 175-202.
- RENZAGLIA, K.S. 1978. A comparative morphology and developmental anatomy of the Anthocerotophyta. **J. Hattori Bot. Lab.** 44: 31-90.
- RON, M.E., A. VELASCO, M.J. PÉREZ ALONSO, J. CEREZO. 1990. Sobre la presencia de flavonoides en musgos. **Anales Jard. Bot. Madrid** 46: 421-426.
- ROTH, G. 1904-1905. **Die europäischen Laubmoose.** Leipzig.
- ROTH, D. 1969. Embryo und Embryotheca bei den Laubmoosen. Eine histogenetische und morphologische Untersuchung. **Bibl. bot.** 129: 1-49.
- SAITO, K. & T. HIROHAMA. 1974. A comparative study of the spores of taxa in the Pottiaceae by use of the scanning electron microscope. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 38: 475-488.
- SATAKE, K. & MIYASAKA, K. 1984. Discovery of bacteria in the cell wall of the aquatic liverwort *Jungermannia vulcanicola* Steph. in an acid stream having pH 4.2-4.6. **J. Bryol.** 13: 277-279.
- SATAKE, K. & K. SHIBATA. 1986. Bacterial invasion of the cell wall of an aquatic bryophyte *Scapania undulata* (L.) Dum. in both acidic and near-neutral conditions. **Hikobia** 9:361-365.
- SATAKE, K., K. SHIBATA & A. TANAKA. 1990. Discovery of bacteria in the cell wall of a moss *Drepanocladus fluitans* in the acid lake Usoriko (Osoresanko), Japan. **Lindbergia** 16:138-142.
- SCHEIRER, D.C. 1978. Cell wall chemistry and fine structure in leptoids of *Dendroligotrichum* (Brtophyta): The end wall. **Amer. J. Bot.** 65(9): 1027-1031.
- SCHEIRER, D.C. 1980. Differentiation of bryophyte conducting tissues: structure and histochemistry. **Bull. Torrey Bot. Club** 107(3): 298-307.
- SCHEIRER, D.C. 1983. Leaf parenchyma with transfer cell-like characteristics in the moss *Polytrichum commune* Hedw. **Amer. J. Bot.** 70:987-992.
- SCHIMPER, W. 1848. **Recherches anatomiques et morphologiques sur les mousses.** Tesis. Estrasburgo.

- SCHIMPER, W. 1856. **Corollarium Bryologiae Europaeae**. Stuttgart.
- SCHIMPER, W. 1860. **Synopsis Muscorum Europaeorum**, 1<sup>a</sup> ed. Stuttgart.
- SCHIMPER, W. 1876. **Synopsis Muscorum Europaeorum**, 2<sup>a</sup> ed. Stuttgart.
- SCHULTZ, F. 1819. **Prodromus florum stargadiensis. Supplementum**. Neubrandenburg.
- SCHULZ, D. & C. WIENCKE. Sporophytenentwicklung von *Funaria hygrometrica* Sibth. II. Differenzierung des Wasser- und Stoffleitungssystem in der Seta. **Flora** 165: 47-60.
- SCHWÄGRICHEN, C.F. 1811. **Species muscorum frondosorum. Supplementum primum**. Leipzig.
- SEEGER, T. 1992. **Biflavonoiden und strukturverwandte Verbindungen aus Laubmoosen unter besonderer Berücksichtigung der Bartramiaceae**. Tesis Doctoral. Universidad de Saarland. Saarbrücken.
- SEEGER, T., H. GEIGER & H.D. ZINSMEISTER. 1991. Bartramiaflavone, a macrocyclic biflavonoid from the moss *Bartramia pomiformis*. **Phytochemistry** 5: 1653-1656.
- SHACKLETTE, H.T. 1967. Copper mosses as indicators of metal concentration. **U.S. Geol. Surv. Bull.** 1198-G: 1-18.
- SHAW, J. & L.E. ANDERSON. 1988. Peristome development in mosses in relation to systematics and evolution. II. *Tetraphis pellucida* (Tetraphidaceae). **Amer. J. Bot.** 75 (7): 1019-1032.
- SHAW, J., B.D. MISHLER & L.E. ANDERSON. 1989. Peristome development in mosses in relation to systematics and evolution. IV. Haplolepidae: Ditrichaceae and Dicranaceae. **Bryologist** 92 (3): 314-325.
- SIEGEL, S.M. 1962. **The plant cell wall**, p. 62. Nueva York.
- SIEGEL, S.M. 1969. **Amer. J. Bot.** 56: 175.
- SMITH, A.J.E. 1978. **The moss flora of Britain and Ireland**. Cambridge.
- SMITH, J.E. 1807. **English botany**. Londres.
- SORSA, P. & T. KOPONEN. 1973. Spore morphology of Mniaceae Mitt. (Bryophyta) and its taxonomic significance. **Ann. Bot. Fenn.** 10: 187-200.
- SPIESS, L.D., B.B. LIPPINCOTT & J.A. LIPPINCOTT. 1981. Bacteria isolated from moss and their effect on moss development. **Bot. Gaz.** 142(4): 512-518.



- SPIESS, L.D., B.B. LIPPINCOT & J.A. LIPPINCOTT. 1984. Facilitation of moss growth and development by bacteria. **J. Hattori Bot. Lab.** 55: 67-77.
- SPIILKOVA, J. & J. HUBIK. 1988. Biologische Wirkungen von Flavonoiden. **Pharmazie uns. Zeit** 4: 174-182.
- SPIILKOVA, J. & J. HUBIK. 1992. Biologische Wirkungen von Flavonoiden. **Pharmazie uns. Zeit** 17 (1): 1-9.
- STAFFORD, H.A. 1990. **Flavonoid metabolism**. Boca Ratón.
- STEVENSON, D.W. 1977. Histochemical and ultrastructural observations on the nacreous walls of the sieve elements of *Atrichum undulatum*. **Ann. Bot.** 41: 849-853.
- STIRTON, J. 1866. **Scott. Natural.** 8: 235.
- TANSLEY, A.G. & E. CHICK. 1901. Notes on the conducting tissues system in Bryophyta. **Ann. Bot.** 15: 1-38.
- TAYLOR, J., P.B. KAUFMAN, L. ALLARD & W.C. BIGELOW. 1972. Scanning electron microscope observations of surface structure of isolated spores of *Asterella tenera*. **Journ. Hattori Bot. Lab.** 36: 406-410.
- VAIZEY, J.R. 1888. On the anatomy and development of the sporogonium of the mosses. **Journ. Linn. Soc.** 24: 262-285.
- VAN HOOF, L., D.A. VANDEN BERGHE, E. PETIT & A.J. VLIETINCK. 1981. Antimicrobial and antiviral screening of Bryophyta. **Fitoterapia** 52:223-229.
- VAN DER WIJK, R. 1932. Morphologie und Anatomie der Musci. In: Verdoorn, F. (ed.) **Manual of Bryology**, pp. 1-40, La Haya.
- VAN DER WIJK, R., W.D. MARGADANT & P.A. FLORSCHÜTZ. 1959-69. Index Muscorum. **Regnum Vegetabile**, 26. Utrecht.
- VAUGHN, K.C. & J. HASEGAWA. 1993. Ultrastructural characteristics of the placental region of *Folioceros* and their taxonomic significance. **Bryologist** 96(1): 112-121.
- VITIKAINEN, O. 1969. On the taxonomy and distribution of *Grimmia anomala* Hampe ex Schimper and *G. hartmanii* Schimper. **Ann. Bot. Fenn.** 6: 236-242.
- VITT, D.H. 1971. A revision of the genus *Orthotrichum* in North America, North of Mexico. **Bryophyt. bibl.** 1: 1-208: 1-60.
- VITT, D.H. 1981. Adaptative modes of the moss sporophyte. **Bryologist** 84: 166-186.

VITT, D.H. & C.D. HAMILTON. 1974. A scanning electron microscope study of the spores and selected peristomes of the North American Encalyptaceae (Musci). **Can. J. Bot.** 52: 1973-1981.

WIENCKE, C. & D. SCHULZ. 1975. Sporophytenentwicklung von *Funaria hygrometrica* Sibth. I. Strukturelle Grundlagen der Wasser- und Nährstoffaufnahme im Haustorium. **Protoplasma** 86: 107-117.

WIENCKE, C. & D. SCHULZ. 1978. The development of transfer cells in the haustorium of the *Funaria hygrometrica* sporophyte. **Bryophytorum Bibl.** 13: 147-167.

WILSON, W. 1807. Eng. Bot. Supp.

ZANDER, R.H. 1993. Genera of the Pottiaceae: mosses of harsh environments. **Bull. Buffalo Soc. Nat. Sci.** 32.